

1962



F. Kaltwasser

=



Aus dem Hygienischen Institut der Universität

Mainz

(Ehem. Direktor Prof. Dr. H. Kliewe)

U N T E R S U C H U N G E N
Ü B E R D I E E N T K E I M U N G V O N
F L Ü S S I G K E I T E N M I T H I L F E
V O N G E S P A N N T E M
A E T H Y L E N O X Y D

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung der Würde des
Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Johannes Gutenberg-Universität

Mainz

vorgelegt von
Franz Kaltwasser
aus Passau/Donau
Mainz 6.6.1962



Referent: Privatdozent v. Wasielewski

Korreferent: Prof. Dr. Kliewe

Dekan: Prof. Dr. Bredt

Inhaltsangabe :

Einleitung	S.1
Entkeimung mit gespanntem Aethylenoxyd	S.8
Aufgabenstellung	14
Sterilisation von Suspensionen unterschiedlich resistenter Keime mit gespanntem Aethylenoxyd	16
Herstellung der Suspensionen	16
Identitätskontrolle	16
Sterilisationsversuche	17
Versuche mit E.coli	17
Versuche mit S.paratyphi B	19
Versuche mit Staphylococcus aureus SG 511	20
Versuche mit B.cereus	20
Versuche mit Gartenerde	23
Virussuspensionen	25
Versuche mit Influenzaviren	30
Prinzip der Versuche	
Herstellung der Suspens.	31
Sterilisationsversuche	31
Inaktivitätskontrolle	32
Kontrolle der Infektiosität	32
Prüfung des Temperatureinflusses	33

Versuchsergebnisse	33
Versuche mit EMC-Viren	36
Prinzip der Versuche	36
Versuchstiere	36
Herstellung der Virussuspension	37
Sterilisationsversuche	37
Inaktivitätskontrolle	37
Kontrolle des Temperatureinflusses	38
Kontrolle der Infektiosität	38
Versuchsergebnisse	39
Versuche mit Theilerviren	43
Einfluß der Flüssigkeitsmenge und der Höhe der Flüssigkeitssäule auf die Sterilisationsdauer	51
Suspendierung der Keime in unterschied- lichen Medien	60
Verhalten der immunisierenden Eigenschaf- ten bei Sterilisation mit gespanntem Aethylenoxyd	62
Herstellung der Vaccine	62
Versuchsergebnisse	63
Einfluß von Aethylenoxyd auf die pyro- gene Wirkung von Keimen	64
Diskussion	68
Zusammenfassung	73
Literatur	74



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Der große Aufschwung, den die Medizin in allen ihren Zweiggebieten in den letzten Jahrzehnten genommen hat, beruht zu einem wesentlichen Teil auf der erfolgreichen Bekämpfung der Infektionskrankheiten und der lokalen Infektionen. Die allgemeine Verbesserung der sozialen Lage der Bevölkerung, die Erleichterung und Verfeinerung der Diagnostik, genauere Vorstellungen über den Verlauf und die Ausbreitung von Infektionen, Maßnahmen der Städte- und Lebensmittelhygiene, Desinfektion und Sterilisation und aktive und passive Immunisierung haben ebenso wie die Entwicklung zahlreicher Sulfonamide und Antibiotika zu diesen Erfolgen beigetragen.

Unzweifelhaft lieferten die Methoden der Desinfektion und Sterilisation, die seit den Zeiten von SEMMELWEISS, LISTER und PASTEUR von der Industrie in großer Zahl und unter ständiger Verbesserung der Medizin zur Verfügung gestellt wurden, einen wesentlichen Beitrag besonders auch für die Prophylaxe der Infektionskrankheiten und der lokalen Infektionen. Auf der anderen Seite hat aber auch die Zahl der Güter, für die wir heute die Keimfreiheit als unbedingt notwendig bzw. schon als selbstverständlich erachten, stark zugenommen.

Ziehen wir in unsere Betrachtung nur die Flüssigkeiten ein, die einer Entkeimung unterzogen werden müssen, so ergibt sich ein besonders großer Bedarf auf dem medizinischen Sektor.

So dürfen, um nur einige Beispiele anzuführen,

sämtliche Medikamente, die in flüssiger Form dem Organismus injiziert bzw. infundiert werden sollen, nur bei völliger Keimfreiheit zur Anwendung kommen. Auch zur Aufbewahrung von sterilem chirurgischen Nahtmaterial in Flüssigkeiten ist deren absolute Keimfreiheit erforderlich. Das gleiche gilt auch für flüssige Substanzen in der Laboratoriumstechnik, wie z. B. die Testsera bei der Blutgruppenbestimmung oder die flüssigen Nährböden in der Bakteriologie, da sich nur so brauchbare Ergebnisse erzielen lassen. Desweiteren muß für Milch- und Gemüseprodukte, die bei der künstlichen Ernährung von Säuglingen Verwendung finden, eine weitgehende Keimfreiheit gefordert werden, um einerseits die gegenüber Infektionen wenig geschützten Säuglinge vor der Besiedlung mit pathogenen Erregern zu bewahren und andererseits ein vorzeitiges Verderben dieser Produkte zu verhindern.

Aber auch in Industrie und Wirtschaft besteht das Problem der Entkeimung von Flüssigkeiten. Hier handelt es sich unter anderem um Ausgangsprodukte bei der Kunststoffherstellung, technisch verwendete Polysaccharide oder Eiweißverbindungen. Diese Stoffe bilden häufig einen geradezu idealen Nährboden für die verschiedensten Keime, die diese Substanzen oft für eine weitere Verarbeitung unbrauchbar machen.

Auch an die Lebensmittelindustrie werden ständig erhöhte Anforderungen in bezug auf die Keimfreiheit gestellt, da viele Nahrungsmittel durch die Besiedlung mit Bakterien und Viren für die menschliche Ernährung unbrauchbar oder, wie im Falle des Botulinus, sogar im höchsten Grade gefährlich werden.

Für all diese Zwecke steht heute eine große Anzahl von Entkeimungsverfahren zur Verfügung, von denen jedes für den Einzelfall Vor- und Nachteile besitzt. Ein ideales Verfahren existiert bisher jedoch noch nicht, was schon aus der Vielzahl der entwickelten Methoden hervorgeht.

Nach KLIWE (62), FUST (31) und KUSCHINSKY (66) sollte ein ideales Entkeimungsverfahren folgende Bedingungen erfüllen :

Es soll alle Keime unter Einschluß der Sporen mit einer an Sicherheit grenzenden Wahrscheinlichkeit abtöten.

Die Abtötung der Keime darf durch die Anwesenheit von Eiweiß, Kunststoffen oder Pektinen nicht gehemmt werden. Dieser Punkt ist besonders wichtig für die Entkeimung von Injektionsflüssigkeiten, die häufig grobmolekulare Stoffe enthalten.

Die zu entkeimende Substanz soll weiterhin durch den Vorgang der Entkeimung in keiner Weise stofflich beeinträchtigt werden.

Eine solche Veränderung wäre z.B. dadurch möglich, daß durch Anwendung von Hitze Eiweißfäulungen einsetzen oder Konzentrationsveränderungen auftreten. Andererseits könnte das Sterilisationsgut durch Zusatz von Phenol und Hg-Verbindungen toxisch und dadurch für eine Weiterverwendung unbrauchbar werden.

Das Verfahren muß außerdem schnell arbeiten.

Es muß jedoch gleichzeitig wirtschaftlich sein, d.h. bei der Installation dürfen keine großen Kosten entstehen, und der Unterhalt und Betrieb müssen billig sein.

Auch sollen die zu entkeimenden Gefäße, Instrumente usw. nicht so stark beansprucht werden, daß sie vorzeitig unbrauchbar werden.

Da die Bedienung meist in den Händen des ärztlichen Hilfspersonals liegt, muß sie einfach auszuführen sein.

Die Gefahr eines Unfalles, einer Explosion oder einer Vergiftung, oder einer Allergisierung muß auch bei einem menschlichen Versagen in der Bedienung gering sein.

Vergleicht man nun einige der wichtigsten von den bisher verwendeten Verfahren mit diesen Forderungen, wobei nur auf die Entkeimung von Flüssigkeiten eingegangen werden soll, so zeigt jedes Verfahren zahlreiche Nachteile.

Diese liegen bei den chemischen Methoden der Entkeimung darin begründet, daß sich eine vollständige Sterilität nur schwer erreichen läßt.

So führt der Zusatz baktericider Substanzen zu Flüssigkeiten nur in wenigen Fällen auch zur Abtötung der Sporen (2, 23, 24, 31, 35, 36, 61, 62, 63, 71, 78, 85, 90). Auch verläuft der Entkeimungsprozeß bei niederen Temperaturen sehr langsam.

Der Wert derartiger Verfahren wird weiterhin meist dadurch eingeschränkt, daß die Anwesenheit von Serum, Eiweißverbindungen, Pektinen, Kunststoffen usw. die Abtötung der Keime behindert.

Dieser Nachteil haftet dem früher viel verwendeten Phenol nicht an. Nach MOELLER (74) genügt eine 2-3 %ige Lösung, um Staphylococcen bei Zimmertemperatur in 2-3 min. zu vernichten.

Resistentere Keime, vor allem aber die Sporen, werden auch durch Phenol in brauchbaren

Konzentrationen nicht beeinflusst.

Im Laufe der Zeit haben sich außerdem phenol-feste Stämme gebildet (90). Auch setzt bei längerer Anwesenheit in eiweißhaltigen Flüssigkeiten eine allmähliche Bindung des Phenols an das Eiweiß ein, was einen Verlust an baktericider Wirkung bedeutet.

Bei Anwendung sehr großer Serummengen, die sich z.B. bei der Behandlung des Botulismus oft nicht umgehen läßt, kann bei Verwendung des gebräuchlichen 0,5%igen Zusatzes die zulässige Maximaldosis /die erreicht oder sogar überschritten werden (MARQUARDT zit.n.24). Das aber kann bei einer Phenolüberempfindlichkeit, auch wenn sie verhältnismäßig selten ist, oder bei Entgiftungsstörungen infolge von Lebererkrankungen zu Vergiftungserscheinungen führen.

Sagrotan, Debacil und Kresol wirken zwar stärker baktericid, besitzen aber die gleichen Nachteile wie das Ihenol.

In den USA versuchte man, durch Hg-Verbindungen wie das Mertiolate oder das Cialit zu einer besseren Lösung zu gelangen. Man konnte mit diesen Substanzen noch in Verdünnungen von 1:5000, bei nicht toxischen Konzentrationen also, eine baktericide Wirkung nachweisen. Dagegen konnten Schimmelpilze nicht beeinflusst werden.

Auch das von DOMAGK (23) mitentwickelte Zephirol und andere Invertseifen brachten keine allgemeingültige Lösung, da sie durch Serum, Eiter usw. abgeschwächt werden, und selbst hohe Konzentrationen nicht zu einer Vernichtung der Sporen führen. DOMAGK erklärte in der oben angeführten

Arbeit selbst : "Gegen Milz- und Gasbrandsporen ist das Zephirol in brauchbaren Konzentrationen ungenügend wirksam ".

Formaldehyd dagegen bewirkt in Gasform eine vollständige Entkeimung unter Einschluß der Sporen. Es wurden zahlreiche Apparate entwickelt (62,76), in denen Formaldehyd bei erhöhter Temperatur eine rasche Sterilität herbeiführt. Abgesehen davon, daß Anlage und Unterhalt dieser Apparaturen verhältnismäßig teuer sind, kommt es leicht zum Haften des Formaldehyd am Sterilisationsgut (59). Das kann aber, z.B. bei der Sterilisation chirurgischen Nahtmaterials, nachfolgend zu Störungen der Wundheilung führen. Auch ist die Bedienung der Apparate wegen der stark reizenden Wirkung des Formaldehyd teilweise unangenehm. Auch können sich Luftinseln ausbilden, in denen Keime den Entkeimungsvorgang überstehen.

Alkohole, z.B. Isopropylalkohol, lassen Sporen unbeeinflusst, sind also nur bedingt zu verwenden.

Durch Heißluft läßt sich dagegen stets eine sichere Vernichtung der Sporen erreichen, insbesondere bei Verwendung des mit bewegter Luft arbeitenden Ja-jag- oder des Vondrangerätes (59).

Leider lassen sich jedoch diese an sich guten Verfahren gerade bei der Sterilisation von Flüssigkeiten oft nur schlecht anwenden, da die hohen Temperaturen zu stofflichen Veränderungen führen, z.B. die bereits erwähnte Hitzekoagulation des Eiweisses oder die Konzentrationsverschiebungen. Auch können sich wiederum Luftinseln bilden, in denen es zu keiner Sterilisation kommt, wie das von der Sterilisation von Gummihandschuhen,

Wäschestücken usw.bekannt ist.

Die gleichen Nachteile haften auch weitgehend den mit gespanntem Dampf arbeitenden Verfahren an.

Die Filtrierung mit Filtern feinster Porengröße scheint für die Entkeimung von Flüssigkeiten besonders geeignet zu sein.Bei diesem Verfahren besteht jedoch die Möglichkeit,daß Keime die Filter durchwuchern,was sich nur durch häufiges Wechseln der Filter vermeiden läßt.Das bedingt aber eine Verteuerung des Entkeimungsvorganges.

Auch läßt sich eine geringe Diffusion von Ionen des Filters in die Flüssigkeit nicht vermeiden. Ein weiterer Nachteil liegt darin,daß neben den Keimen auch andere grobmolekulare Stoffe durch die Filter zurückgehalten werden können,deren Anwesenheit in der sterilen Flüssigkeit erforderlich ist,z.B.bei der Sterilisation von Sera.

Die notwendige Anwendung von Unterdruck führt außerdem zur Schaumbildung und damit zu einer Behinderung des Arbeitsvorganges.

In jüngster Zeit werden zur Entkeimung besonders von Lebensmitteln immer häufiger Röntgen- und UV-Strahlen herangezogen.Zahlreiche Nachteile (65) gestatten jedoch nur eine beschränkte Anwendung dieses Verfahrens.

Bei der Entkeimung von Trockenkulturen mit Aethylenoxyd waren dagegen gute Erfahrungen gesammelt worden (32,45,47,54,57-60,67-70,72,73,94,96),die auch Versuche speziell zur Entkeimung von Flüssigkeiten angebracht erscheinen ließen.

Die Entkeimung mit Hilfe von gespanntem Aethylenoxyd

Die Entkeimung mit Hilfe von gespanntem Aethylenoxyd ist ein kombiniertes chemisch-physikalisches Verfahren. Es beruht auf der Einwirkung von gasförmigem Aethylenoxyd unter erhöhtem Druck und geringfügig erhöhter Temperatur.

Das Aethylenoxyd (Aeto), auch T-Gas genannt, ist bei Zimmertemperatur ein farbloses Gas, das einen ätherischen Geruch besitzt. Seine wichtigsten physikalischen Eigenschaften sind in Tabelle 1 zusammengefaßt :

Mol.Gewicht	44,05
Siedepunkt	10,73 ° C
Dichte bei -51,1 ° C	0,9641
Dampfdruck bei -20 °C	ca. 0,30 atm
Dampfdruck bei 0 °C	0,73 atm
Dampfdruck bei +40 °C	2,90 atm
Oberer Heizwert	6860,0 kcal/kg
Kritische Temperatur	192,0 °C
Zündtemperatur in Luft	430,0 °C
Selbstzündungstemperatur	571,0 °C
Luftbedarf	7,83 kg/kg
Untere Explosionsgrenze	59,0 g/m ³
Obere Explosionsgrenze	1575,0 g/m ³
Kritischer Druck	71,0 atm

Tab.1: Physikalische Eigenschaften des Aethylenoxyds (67,69,85,94)

Chemisch gesehen ist das Aeto den Epoxyverbindungen zuzurechnen, deren einfachster Vertreter es ist (94).

Seine Strukturformel lautet $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{H} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{HC} \text{---} \text{O} \text{---} \text{CH} \end{array}$,
die Summenformel $(\text{CH}_2)_2\text{O}$.

Es ist also ein 1,2 oxido-aethan.

Nach der Bayerischen Ringspannungstheorie handelt es sich beim Aeto also um einen sehr reaktiven Körper (94).

Das Gas ist auf technischem Wege verhältnismäßig einfach herzustellen und daher billig. In Luft und Wasser ist es nicht beständig, sondern wird allmählich zu gesättigtem Aethylenglykol $\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$ hydrolysiert.

Das Aeto besitzt eine narkotische Wirkung und soll beim Menschen bei 50 - 100000 ppm sofort zum Tode führen. Da das Aeto jedoch bei solch hohen Konzentrationen stark reizend auf die Schleimhäute wirkt, kommt es meist nicht zum Einatmen toxischer Dosen (75,99). Bisher wurden auch nur 2 Zwischenfälle beim Menschen beschrieben, die ohne Folgen ausheilten (81). Hunde und Ratten dagegen verendeten im Versuch nach Einatmung hoher Dosen nach 1 Std. in tiefer Narkose. Die Autopsie ergab eine Pneumonie und Enteritis bei allgemeiner Hyperaemie (95). Auf Grund dieser Untersuchungen legte die Schweizerische Unfallversicherungsanstalt (91) den Giftschwellenwert mit 50 ppm fest. SEXTON (92), CANTZLER (14), NEGHERBON (75) u.a. dagegen halten eine maximale Arbeitsplatzkonzentration von 100 ppm noch für erträglich. Im Vergleich zum Formaldehyd liegt dieser Wert etwa 10 x niedriger.

Beim Arbeiten mit Aeto besteht weiterhin die Gefahr einer Hautschädigung. Das Aeto wirkt in reiner Form oder bei Mischung mit Wasser bzw. organischen Lösungsmitteln stark reizend auf die Haut. Die gleiche Gefahr besteht auch bei der Sterilisation von Gummi, da Aeto sich in Gummi leicht löst.

Die ersten Angaben über eine baktericide Wirkung des Aeto machten SCHRADER und BOSSERT im Jahre 1929 (zit.n.94). Diese Autoren meldeten ein Verfahren zum Patent an, das mit einem gasförmigen Aeto - CO_2 -Gemisch arbeitete. Einzelheiten über die Sterilisationsdauer usw. waren der Meldung jedoch nicht zu entnehmen.

Die insecticide Wirkung des Aeto hatten COTTON und ROARK (17) bereits im Jahre 1928 beschrieben. In den folgenden Jahren wurden zahlreiche Verfahren zur Entkeimung mit Aeto entwickelt, die unter Verwendung von flüssigem bzw. gasförmigem Aeto bei Normal-, Über- oder Unterdruck arbeiteten.

Mit flüssigem Aeto sterilisierten WILSON und BRUNO (103). Sie kühlten flüssige Nährböden, Milch und Serum auf 0°C und setzten auf 0°C abgekühltes Aeto in einer Konzentration von 1 Vol% zu. Anschließend erwärmten sie das Gemisch 24 Std. bei 37°C und konnten so eine vollständige Keimfreiheit erreichen. Das Verfahren, das auch zur Entkeimung von Schuhen, Gipsverbänden und Futtermitteln verwendet wurde (44,48), konnte sich jedoch nicht durchsetzen, da eine zu lange Sterilisationsdauer erforderlich war. Außerdem wurde beim Erwärmen des Gemisches Aeto in Gasform frei, wodurch die Gefahr einer Vergiftung bzw. einer Explosion bestand.

Eine wesentliche Verkürzung der Sterilisationsdauer konnten GROSS und DIXON (38) dadurch erreichen, daß sie gasförmiges Aeto bei erhöhter Temperatur in ein vorher evakuiertes Gefäß einströmen ließen. Das Sterilisationsgut war dabei in Abhängigkeit von der Natur des Keimträgers nach $2\frac{1}{2}$ - 5 Std. entkeimt.

GRIFFITH (37) benötigte mit einer ähnlichen Versuchsanordnung zur Abtötung anaerober Keime bei 85°C mehr als 5 Std. FRIEDL (29) und KAYE (50-52) dagegen wiesen in ausgedehnten Versuchen nach, daß Suspensionen von *Cl. sporogen.* bzw. *B. subtilis* bei $20 - 25^{\circ}\text{C}$ erst nach 18 Std. steril waren, *E. coli* und *B. globii* aber schon nach 60-180 min. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten RAUSCHER (81), CORETTI (16), KELCH (54), KAEMMERER (49) und MAYER (72, 73).

Die Sterilisation bei normalem Druck empfehlen VELY (98), LAMMERS (67, 68, 70), KÖRNLEIN und SEIBEL (64) sowie FULTON (30). Dieses Verfahren ist wohl für bestimmte Zwecke geeignet, z.B. für die Sterilisation von Material in Plastikbeuteln, die Entkeimung benötigt jedoch 48 Std.

Der große Nachteil all dieser Verfahren, nämlich die sehr lange Sterilisationsdauer, ließ sich nur durch eine Einwirkung des Aeto bei erhöhtem Druck und erhöhter Temperatur umgehen. Die in dieser Richtung unternommenen Versuche scheiterten jedoch daran, daß die verwendeten Gasgemische infolge des niedrigen kritischen Druckes und der ebenfalls niedrigen Selbstzündungstemperatur des Aeto leicht explodierten. 1930 wiesen KENNEDY und JONES (55, 56) nach, daß

sich diese Explosionsgefahr durch eine Mischung des Aeto mit inerten Gasen, z.B. Stickstoff oder CO_2 etwa im Verhältnis 10% Aeto : 90% inertes Gas, beseitigen ließ.

Auf dieser Erkenntnis bauten LAMMERS und GEWALT (33, 67-70) ihr Verfahren auf, das mit gespanntem Aeto arbeitet.

In Abb. 1 sind die Arbeitsvorgänge schematisch dargestellt.

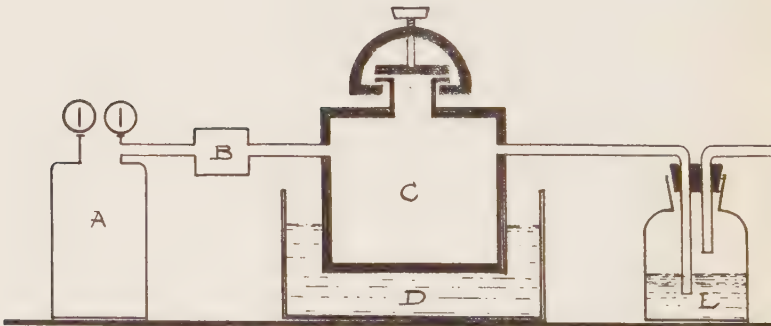


Abb. 1 : Schematische Darstellung des Sterilisationsvorganges bei Anwendung von gespanntem Aeto

A = Druckflasche mit dem flüssigen Aeto - CO_2 Gemisch

B = Gasvorwärmer

C = Druckkammer

D = Wasserbad

E = Absorber mit CaCl_2

In der Druckflasche A befindet sich das Gemisch von Aeto und CO_2 mit einem maximalen Aetogehalt von 17 Vol.% unter einem hohen Druck, bei dem das Gemisch flüssig ist.

Über den Gasvorwärmer B strömt das Gas in den Druckkessel C, der durch ein Wasserbad D auf die gewünschte Temperatur gebracht wird.

Vor jeder Sterilisation wird der Druckkessel einmal mit dem Gemisch durchspült, um die Bildung von Luftinseln zu verhindern.

Nach Beendigung der Sterilisation wird das Gas über den Absorber E abgeblasen, in welchem sich CaCl_2 befindet. Dabei wird das giftige Aeto in ungiftiges Aethylenchlorhydrin überführt.

Im allgemeinen genügen für die Sterilisation Temperaturen zwischen $35 - 65^\circ\text{C}$ und ein Druck von etwa 5 atü, um selbst resistente Sporen in weniger als 60 min. abzutöten.

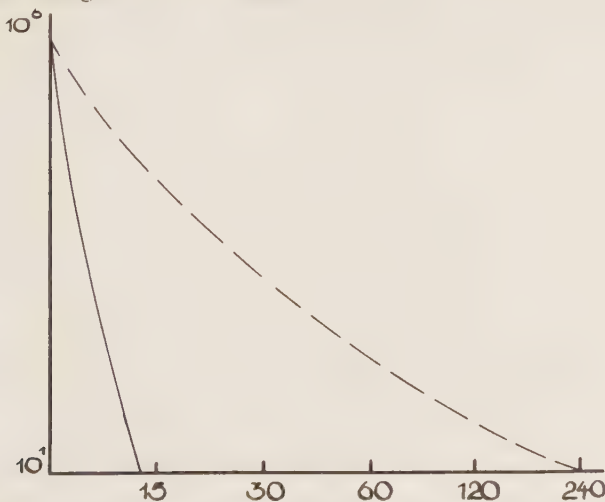


Abb. 2: Abtötung von Subtilissporen durch Aeto
— 10% Aeto+ 90% CO_2 bei 5 atü und 40°C
---- 50% Aeto-Luftgemisch bei Normaldruck

Die Abb.2, entnommen der Arbeit von LAMMERS und SEIBEL (70), zeigt den Einfluß der Druckerhöhung auf die Überlebenszeit von Subtilissporen. Während diese bei Normaldruck erst nach 240 min, abgetötet werden, genügen bei einem Druck von 5 atü zur Erreichung des gleichen Zieles 15 min. Nach den Versuchen von LAMMERS und GEWALT (69) verlängert die Anwesenheit von Serum, Eiweißverbindungen oder Kunststoffen die Sterilisationsdauer nicht wesentlich. Lediglich größere Mengen konzentrierter Salz-, Zucker- oder Thioglykolatlösungen können eine längere Sterilisation erforderlich machen, da diese Stoffe einen Teil des Aeto chemisch binden.

Die Sterilisation mit Hilfe von gespanntem Aeto bietet also wesentliche Vorteile gegenüber anderen Sterilisationsverfahren.

Die meisten Versuche wurden jedoch bisher mit Trockenkulturen unternommen. Die Ergebnisse dieser Versuche können aber nicht einfach auf die Sterilisation von Flüssigkeiten übertragen werden.

Aufgabenstellung :

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand darin, die bisher bei der Sterilisation von Flüssigkeiten mit gespanntem Aeto gesammelten Erfahrungen zu überprüfen und zu erweitern.

Es ergaben sich folgende Fragenkomplexe :

- 1.) Welche Sterilisationsdauer ist zur Abtötung verschiedener Keime in Flüssigkeiten erforderlich ?
- 2.) Wie beeinflussen die Flüssigkeitsmenge und die Höhe der Flüssigkeitssäule die Sterilisationsdauer ?
- 3.) Wird die keimtötende Wirkung des Aeto durch die Suspendierung der Keime in Serum bzw. salzhaltige Flüssigkeiten gehemmt ?
- 4.) Verändern sich die immunisierenden Eigenschaften durch gespanntes Aeto ?
- 5.) Kann die pyrogene Wirkung infizierter Flüssigkeiten durch Aeto aufgehoben werden ?

Sterilisation von Suspensionen unterschiedlich resistenter Keime mit gespanntem Aeto

FUST (31) schlug auf dem VI. Internationalen Kongreß für Mikrobiologische Standardisierung vor, zur Testung der Leistungsfähigkeit von Sterilisationsverfahren stets gleiche Keime zu benutzen, da sich nur so vergleichbare Ergebnisse erzielen lassen. Zu diesem Zwecke stellte er eine Liste repräsentativer Keime zusammen, von denen wir zu unseren Versuchen *E.coli*, *S. paratyphi B* und *Staphylococcus aureus* SG 511 heranzogen. Außerdem testeten wir Suspensionen des sporenbildenden *Bac. cereus* und Aufschwemmungen

von Gartenerde.

Wir verwendeten für unsere Versuche Gefäße von 2 cm Höhe und einer lichten Weite von 12 mm, die stets 1 cm hoch gefüllt wurden. Die Gefäße enthielten bei dieser Füllung etwa 1,1 ml Keimsuspension.

Die Wandstärke der Gefäße war in meßbaren Grenzen gleich.

Herstellung der Keimsuspensionen :

Die Keimaufschwemmungen wurden auf folgende Weise hergestellt :

Für alle Versuche mit einem Keim wurde eine gleichbleibende Stammkultur verwendet, von der zu Beginn eines jeden Versuches 3 Schrägagarröhrchen beimpft wurden. Nach 24 Std. Aufenthalt im Brutschrank bei 37°C wurden die Kulturen durch 3 maliges Zentrifugieren von 10 min. Dauer mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen. Im Anschluß daran schwemmten wir den Bodensatz mit etwa 5 ml auf. Die so gewonnene dickflüssige Keimsuspension stellten wir durch Weiterverdünnen vor dem Nephelometer auf einen für alle Versuche gleichen Trübungsgrad ein, um einen wenigstens annähernd gleichen Keimgehalt zu gewährleisten.

Identitätskontrolle :

Mit dieser Suspension beimpften wir vor Beginn der Versuche zum Zwecke der Identitätskontrolle 3 Bouillonröhrchen sowie 1 Platte mit Spezialnährböden (Blut-, Endoplatte), die 24 Std. im Brutschrank bei 37°C bebrütet wurden.

Sterilisationsversuche :

Anschließend füllten wir 33 bzw. bei den Versuchen mit *B.cereus* und Sporenerde 45 der auf S.16 beschriebenen Gefäße 1 cm hoch mit der Keimsuspension an und setzten sie in Gruppen zu je 3 dem Aeto im Sterilisationsapparat aus.

Die Temperatur betrug bei allen Versuchen 40°C, der Druck 5 atü. Bei den Versuchen mit *E.coli*, *S.paratyphi B* und *Staph.aur.SG 511* wurden je 3 Röhrchen 10, 15, 20 min usw. in Abständen von 5 min bis zu 60 min lang sterilisiert, bei den restlichen Versuchen 10-90 min. lang.

Im Anschluß an den Sterilisationsvorgang wurden von jeder Probe zur Kontrolle der Sterilisation mit der Platinöse 1 Bouillonröhrchen und 1 Quadrant eines Spezialagarnährbodens beimpft, die ebenfalls 24 Std. bei 37°C bebrütet wurden. Dann wurde das Ergebnis abgelesen.

Versuche mit *E.coli* :

Die ersten Versuche führten wir mit *E.coli* durch. Dieser Keim hatte sich bei den Versuchen von LAMMERS und GEWALT (69) als wenig resistent erwiesen. Wir führten mit diesem Keim 10 Versuchsreihen durch, deren Ergebnisse in Tab.2 zusammengestellt sind. Jedes angegebene Ergebnis entspricht der Testung durch 3 Röhrchen, von denen jedes auf einem festen und einem flüssigen Nährboden kontrolliert wurde.

Nr d. Ver	Zeit in Minuten											
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tab.2 : Sterilisation von 1 ml Keimsuspension von E.coli mit gespanntem Aeto bei 40°C und 5 atü.Suspendierung in physiol.NaClLös.
 Zeichenerklärung : + = Subkulturen unsteril
 - = Subkulturen steril

Wie aus der Tab.2 hervorgeht, fand sich bei allen Proben, die nur 10 bzw. 15 min lang sterilisiert worden waren, ein Keimwachstum in den Subkulturen. Eine Sterilisation von 20 min dagegen genügte in 9 von 10 Versuchsreihen, um sämtliche Keime abzutöten; die Subkulturen blieben steril. Lediglich in einem Versuch zeigte sich bei 20 min, Sterilisationsdauer ein geringes Keimwachstum in der Subkultur. Alle Proben, die 25 min, und länger sterilisiert worden waren, erwiesen sich bei der Sterilisationskontrolle selbstverständlich ebenfalls als steril.

Es darf also angenommen werden, daß eine Sterilisationsdauer von 20 min. ausreicht, um 1 ml einer Aufschwemmung von E.coli in physiol. NaCl-Lösung sicher zu entkeimen.

Versuche mit Salmonella paratyphi B :

Als widerstandsfähiger erwies sich in weiteren Versuchen die S. paratyphi B.

Die Identitätskontrolle erfolgte bei diesen Versuchen durch Verimpfen auf Endoplaten und Bouillonröhrchen.

Tab.3 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche.

Nr. d. Ver.	Zeit in Minuten										
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Tab.3 : Sterilisation von 1 ml Keimsuspension von S. parat. B mit gespanntem Aeto bei 40°C und 5 atü. Suspendierung in NaCl phys. Zeichenerklärung s. Tab.2

Wurden die Proben 10,15 oder 20 min lang sterilisiert, so trat in allen Subkulturen ein Keimwachstum auf. Die S. parat. B war also nach 25 min noch nicht abgetötet.

Erst bei einer Sterilisationsdauer von 30 min. blieben die Subkulturen steril. Auch alle Proben, die länger als 30 min. sterilisiert worden waren, erwiesen sich bei der Inaktivitätskontrolle als steril.

Um 1 ml einer Suspension von S. paratyphi B sicher zu entkeimen, ist also bei diesem Verfahren eine Sterilisationsdauer von 30 min erforderlich.

Versuche mit Staphylococcus aureus SG 511 :

Die Versuche mit dem Staph. aur. SG 511 zeigten, daß die Resistenz dieses Keimes gegenüber gespanntem Aeto etwa in der gleichen Größenordnung liegt wie die von E. coli.

Aus der Tab. 4, in der wir unsere Versuchsergebnisse eingetragen haben, läßt sich ersehen, daß eine Sterilisationsdauer von 10 bzw. 15 min, nicht genügte, um diesen Keim abzutöten.

Sterilisierten wir dagegen 20 min. lang und länger, so blieben die Subkulturen steril.

Zur sicheren Entkeimung von 1 ml Keimaufschwemmung von Staph. aur SG 511 werden also 20 min benötigt.

Versuche mit Bac. cereus :

Die Abtötung der bisher untersuchten Keime stellt an die Qualität eines Sterilisationsverfahrens

Nr. d. Ver.	Zeit in Minuten										
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab.4 : Sterilisation von 1 ml Keimaufschwemmung von Staph.aur.SG 511 in physiol.NaCl-Lös. mit Aeto bei 40°C und 5 atü.
Zeichenerklärung s.Tab.2

keine besonders hohen Ansprüche. Sie gelingt auch mit anderen Methoden genügend schnell und mit ausreichender Sicherheit. Größere Schwierigkeiten ergeben sich dagegen bei der Entkeimung von Flüssigkeiten, die mit sporenbildenden Keimen infiziert sind. Es läßt sich zwar häufig die Vernichtung der vegetativen Formen verhältnismäßig leicht erreichen, die Sporen überleben jedoch häufig den Entkeimungsvorgang. Sie keimen dann aus und infizieren die Flüssigkeit erneut. Eine sichere Vernichtung der Sporen muß daher durch ein Sterilisationsverfahren unbedingt

gewährleistet werden, insbesondere deshalb, weil sich unter den Sporenbildnern für den Menschen höchst pathogene Keime befinden, z.B. die anaeroben des Genus der Clostridien (*Cl. tetani*, *botul.*, *perfringens* u.a.) oder die aeroben (*B. anthracis*), mit deren Vorkommen überall zu rechnen ist.

Wir zogen zu unseren Versuchen den *B. cereus* heran.

Um sicherzustellen, daß in den Kulturen auch eine ausreichende Sporulation vorlag, wurde vor jedem Versuch sowohl ein mikroskopisches Präparat in der üblichen Weise angefertigt als auch die Hitze-resistenz der Keimsuspension geprüft.

Nr. d. Vers.	Zeit in Minuten											
	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	
1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
5	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
6	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
9	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	
10	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	

Tab. 5 : Sterilisation von 1 ml Keimsuspension von *B. cereus* mit Aeto bei 40°C und 5 atü bei Suspendierung in physiol. NaCl-lösung. Zeichenerklärung s. Tab. 2

Zur Prüfung der Hitzeresistenz wurde ein Teil der Cereussuspension 10 min lang auf 80°C erhitzt, um alle vegetativen Formen abzutöten (33).

Von dieser Probe beimpften wir dann eine Agarplatte und 1 Bouillonröhrchen, die 24 Std. lang bei 37°C bebrütet wurden. Ein Wachstum von Keimen auf diesen Nährböden erbrachte den Nachweis der Anwesenheit von Sporen in der Suspension.

Der weitere Verlauf des Versuches glich dem bei den übrigen Keimen.

Unsere Versuchsergebnisse mit diesem Keim sind in Tab.5 zusammengefaßt.

Wie aus der Tab. hervorgeht, erwiesen sich alle Proben, die weniger als 35 min sterilisiert worden waren, bei der Inaktivitätskontrolle als unsteril. Sterilisierten wir 35 min lang, so zeigten 2 Proben kein Keimwachstum mehr. Erst nach 40 min waren alle Röhrchen keimfrei.

Entkeimung von Gartenerde :

Alle Versuche mit Keimen in Reinkultur, auch mit Bacillen, ergeben nur einen bedingt richtigen Eindruck von der Leistungsfähigkeit eines Sterilisationsverfahrens. In praxi haben wir es nur selten mit Reinkulturen zu tun. Die Keime treten im allgemeinen in einem bestimmten Milieu auf, das ihnen einen gewissen Schutz vor der Abtötung bietet.

Dieser Schutz kann einmal darin bestehen, daß die Keime dem Staub, dem Sputum usw. so angelagert sind, daß die sterilisierende Substanz nur schwer

bis zu ihnen gelangen kann.

Zum anderen besitzen die verwendeten Substanzen neben der Affinität zu den Keimen auch eine solche zu den sie umgebenden Stoffen. Das bedingt einen Verlust an Wirksamkeit. Wird dieser Schwund nicht durch ein Überangebot ausgeglichen, so kann die noch zur Verfügung stehende Menge für eine wirksame Sterilisation zu gering sein (31).

Aus diesen Gründen hat es sich eingebürgert, zur Testung der Leistungsfähigkeit eines Sterilisationsverfahrens Gartenerde heranzuziehen.

Auch wir führten diesen Test durch.

10 verschiedene Erdproben wurden in der bereits angegebenen Weise auf die Anwesenheit von Sporen geprüft, in physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und bei 40°C und 5 atü 10-90 min lang mit einem Abstand von je 5 min sterilisiert.

Um die Bedingungen für die Sterilisation möglichst ungünstig zu gestalten, legten wir keinen Wert auf eine feine und gleichmäßige Verteilung der Erde in der Flüssigkeit, sondern schüttelten die Erdproben nur oberflächlich auf. Die Klumpung blieb dabei weitgehend bestehen.

Die Ergebnisse unserer Versuche sind in Tab. 6 zusammengestellt.

Bei einer Sterilisationsdauer von 10 - 55 min konnte in keinem Fall eine Keimfreiheit erreicht werden. Alle Subkulturen zeigten ein Keimwachstum. Von den Proben, die 60 min lang sterilisiert worden waren, erwiesen sich 2 bei der Inaktivitätskontrolle als steril. Volle Keimfreiheit aller Erdproben konnten wir dagegen erst nach 65 min erzielen. Sterilisierten wir länger als 65 min, so waren ebenfalls alle Proben steril.

Nr. des Vers.	Zeit in Minuten										
	10	20	30	40	50	55	60	65	70	80	90
1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
6	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
7	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
8	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
9	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Tab.6 : Sterilisation von 1 ml Keimsuspension von Gartenerdproben mit Aeto bei 40°C und 5 atü bei Suspendierung in physiol.NaCl-lösung. Zeichenerklärung s.Tab.2

Aus diesen Versuchen kann geschlossen werden, daß zur sicheren Entkeimung von 1 ml Flüssigkeit selbst bei Vorhandensein resistenter Keime eine Sterilisationsdauer von 65 min ausreicht. Der große Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß zur Erreichung der Sterilität nur eine Temperatur von 40°C erforderlich ist.

Versuche zur Entkeimung virusinfizierter Flüssigkeiten

Die Abtötung von Viren ist gerade in jüngster Zeit erneut Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen.

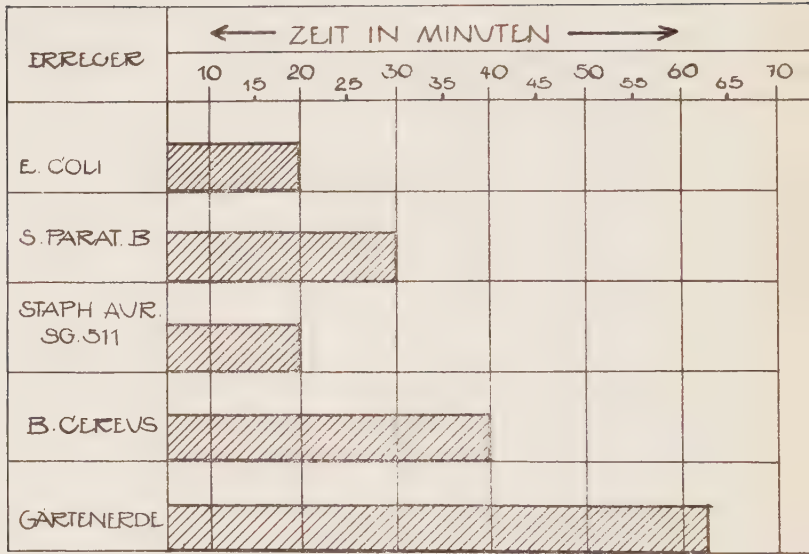


Abb.3 : Zusammenfassung unserer Versuche zur Entkeimung von 1 ml physiologischer NaCl-Lösung, die mit den angeführten Erregern infiziert war. Sterilisation mit Aeto bei 40°C und 5 atü.

Hierbei stellte sich heraus, daß weder mit chemischen noch mit thermischen Verfahren sichere Aussagen möglich sind. Dies lag z.T. an der unterschiedlichen Resistenzlage nicht nur der einzelnen Virusarten sondern auch der Stammvarianten gegenüber den chemischen und physikalischen Einflüssen (2,11,36). Inwieweit diese ausgeprägte Variabilität nur eine Funktion des Milieus ist, läßt sich bisher kaum entscheiden, da das virushaltige Material infolge des obligaten Zellparasitismus der Viren stets aus lebendem Gewebe gewonnen werden muß.

Die Reindarstellung von Viren, d.h. die Befreiung des infektiösen Agens von belastenden Gewebestrümmern, erfordert methodisch einen so großen Aufwand, daß die meisten Versuche an ungereinigtem Material vorgenommen werden.

Bevor man aber über die Schutzfunktion der jeweils qualitativ und quantitativ unterschiedlichen Ballaststoffe, die natürlich ihrerseits mit den verschiedenen chemischen und physikalischen Noxen unterschiedlich reagieren, genauere Kenntnisse besitzt, wird eine Aussage stets nur einen Annäherungswert darstellen.

Andererseits wurde bereits erörtert, daß für die praktische Anwendung eines Sterilisationsverfahrens gerade die Abtötung der Keime in ihrem spezifischen Milieu ausschlaggebend ist.

Für die Bewertung von Methoden zur Abtötung von Viren in Flüssigkeiten müssen prinzipiell die gleichen Forderungen aufgestellt werden wie für die Entkeimung bakteriell infizierter Keime, d.h. ein Verfahren soll in möglichst kurzer Zeit ohne große Kosten auf technisch einfachem Wege zu einer sicheren Sterilität führen, ohne daß dabei die Trägersubstanz bzw. die Verpackung chemisch oder physikalisch stärker verändert werden. Aber auch für die Vernichtung von Viren existiert noch kein Verfahren, das alle diese Forderungen auch nur annähernd erfüllt.

Als sicherste Methode zur Entkeimung virusinfizierten Materials galt bisher die Erhitzung auf über 100°C . Aus den bereits in der Einleitung erörterten Gründen läßt sich aber dieser Weg häufig

nicht beschreiten.

Versuche, mit einer niedrigeren Temperatur und entsprechend verlängerter Sterilisationsdauer zu einem befriedigenden Ergebnis zu gelangen, schlugen fehl (11,36). Es ließen sich auf diesem Wege zwar empfindlichere Viren, z.B. das Influenzavirus, abtöten, resistenteren Viren dagegen, wie die Theiler- und Poliomyelitisviren überlebten eine Exposition von 60°C länger als 8 Std..

Auch die Versuche, auf chemischem Wege eine bessere Lösung zu finden, führten bislang nicht zu dem gewünschten Erfolg. Zudem machen sich die eingangs erwähnten Einflüsse der Ballaststoffe und die der Viruskonzentration bei derartigen Versuchen besonders störend bemerkbar. Dadurch lassen sich wohl auch die Unterschiede in der Beurteilung ein und desselben Stammes in bezug auf die chemische Resistenz durch verschiedene Untersucher zum Teil erklären, z.B. GÖNNERT und BOCK (36) und ALBRECHT (2) in bezug auf Herpes, Theiler und Poliomyelitis. GÖNNERT und BOCK (36) führten ausgedehnte Untersuchungen zu diesem Fragenkomplex durch. Sie fanden, daß empfindlichere Viren, z.B. Influenza- und Bronchopneumoviren durch KMnO_4 , Delegol, Zephirol und Formalin auch bei niedrigen Konzentrationen in kurzer Zeit abgetötet werden. Die gleichen Verff. ließen dagegen Zephirol und Delegol bis zu 500 Std. ohne Erfolg auf Theilerviren einwirken. Dieses Virus ließ sich nur durch Formalin und KMnO_4 in Konzentrationen jenseits der Toxizitätsgrenze beeinflussen. Ebenso verhielten sich auch das EMC- und das Herpesvirus. Eine sichere Entkeimung war auf diesem Wege also ebenfalls nicht möglich.

Da das Wirkungsoptimum der Viren stark pH-abhängig ist, wurde versucht, durch Änderung des pH-Wertes die Viren zu vernichten (36). Dabei erwies sich das gegen chemische und physikalische Einflüsse resistente EMC-Virus als verhältnismäßig empfindlich, während das Influenzavirus nur wenig beeinflusst werden konnte. Das Theilervirus ließ sich nur bei extremen pH-Verschiebungen in seiner Virulenz geringfügig abschwächen. Eine Vernichtung der Viren konnte in keinem Fall erreicht werden.

Auch mit Aeto wurden zahlreiche Versuche zur Sterilisation virusinfizierter Flüssigkeiten unternommen. Dabei wurde zunächst wieder so vorgegangen, daß man in die Virussuspension flüssiges Aeto einströmen ließ. WILSON und BRUNO (103) erzielten auf diese Weise bei 37°C nach 24 Std. Keimfreiheit einer Vacciniaaufschwemmung, wenn die Konzentration des Aeto 1 Vol% betrug. Unter den gleichen Bedingungen konnten auch Maul- und Klauenseucheviren sowie Influenzaviren abgetötet werden.

POLLEY (82) führte seine Versuche bei +4°C durch. Er erhielt ein nicht mehr infektiöses stabiles Antigen von Mumps- und Influenzaviren, wenn er 5 Vol% Aeto 48 Std. einwirken ließ.

FELLOWES (26) dagegen konnte eine Abtötung von Maul- und Klauenseucheviren in 1 Std. erreichen. Er ließ flüssiges Aeto bei 37°C einwirken. Erniedrigte er die Temperatur auf +4°C, so verlängerte sich die Sterilisationsdauer auf 2 Std.

Gasförmiges Aeto unter Normaldruck tötete Maul- und Klauenseucheviren bei Zimmertemperatur nach 30 Std. ab (94). Die ersten Versuche zur Sterilisation virushaltigen Materials mit Aeto im Vakuum gehen auf KLAREN-

BECK und van TONGEREN (58) zurück. Diese benötigten 8 Std. bei 18-20°C zur sicheren Entkeimung einer Vacciniaaufschwemmung.

Die Ergebnisse aller dieser Versuche waren z.T. sehr widersprechend. Sie benötigten aber fast alle eine verhältnismäßig lange Sterilisationsdauer.

LAMMERS und GEWALT (33,67-70) führten im Anschluß an ihre Versuche zur Abtötung von Bakterien und Bacillen mit Hilfe von gespanntem Aeto orientierend auch Versuche mit Viren durch. Sie konnten nachweisen, daß selbst die resistenten Theilerviren bei 45°C in etwa 45 min vernichtet werden. Eine sichere Entkeimung ließ sich in ihren Versuchen jedoch nur dann erreichen, wenn die Menge des virushaltigen Materials 2,0 g nicht überschritt. Diese Versuchsergebnisse sollten in der vorliegenden Arbeit überprüft und auf größere Mengen virus-haltigen Materials ausgedehnt werden.

Wir zogen zu unseren Versuchen folgende Viren heran: Influenza A, Herpes, EMC und Theiler.

Versuche mit dem Influenzavirus :

Prinzip der Versuche :

Mit Influenzaviren infizierte Allantoisflüssigkeit von Hühnerembryonen wurde dem Aeto bei 40 und 60°C und 5 atü verschieden lange ausgesetzt. Die Inaktivitätskontrolle erfolgte durch Verimpfen auf Bruteier und anschließenden Hirsttest.

Zur Kontrolle der Infektiosität wurde 1 Probe der Allantoisflüssigkeit nicht sterilisiert, jedoch wie die sterilisierten Proben auf Bruteier verimpft und nach Hirst getestet.

Zur Prüfung, inwieweit die angewendeten Temperaturen die Virusaktivität beeinflussen, wurden 2 Proben bei 40 bzw. 60°C im Wasserbad gehalten und ebenso wie die sterilisierten Proben verimpft und getestet.

Methodisch wurde im einzelnen folgendermaßen vorgegangen :

Der von uns verwendete Stamm war der in unserem Institut gezüchtete eiadaptierte Influenzastamm A P R 8.

Herstellung der Virussuspension :

Zur Aufrechterhaltung der Virulenz wurden die jeweils in den Test genommenen Virussuspensionen aus fortlaufenden Hühnerembryonenpassagen entnommen. Im Versuch wurde die infizierte Allantoisflüssigkeit von 6 Eiern steril abgesaugt. Jede wurde im Hirsttest gesondert auf ihre haemagglutinatorischen Eigenschaften geprüft.

Die positiv reagierenden Flüssigkeiten wurden gemischt und zur Entfernung von Zelltrümmern kurz bei 500 U/min zentrifugiert.

Im Ei kann mit etwa 5 ml Allantoisflüssigkeit gerechnet werden. Wir erhielten daher von den 6 Eiern 30 ml, die wir im Verhältnis 1 : 4 verdünnten. So standen uns 120 ml zur Verfügung.

Sterilisationsversuche :

8 Gefüße von 3,6 cm Durchmesser wurden 1 cm hoch mit Allantoisflüssigkeit gefüllt. Sie enthielten dann etwa 10 ml. 4 Proben wurden unter den üblichen Bedingungen - 40°C und 5 atü - sterilisiert, und zwar je

eine Probe 30,40,60 und 80 min.lang.
Bei den restlichen 4 Proben erhöhten wir die Temperatur bei gleichbleibendem Druck auf 60°C und sterilisierten ebenfalls 30-60 min.lang.

Inaktivitätskontrolle:

Die Inaktivitätskontrolle erfolgte durch Verimpfen auf 10 Tage alte Bruteier. Vor der Beimpfung durchleuchteten wir die Eier und sonderten alle diejenigen aus, die keinen lebenden Embryo enthielten. Als Anzeichen für Leben galten dabei sichtbare Blutgefäße bzw. Bewegungen des Keimlings. Bei der Durchleuchtung suchten wir über der Allantoishöhle eine Stelle auf, die frei von Blutgefäßen war. Hier injizierten wir nach kurzer Reinigung mit Alkohol 0,3 ml Keimsuspension. Mit jeder Probe wurden 5 Eier beimpft. Nach Verschuß der Öffnung durch Paraffin ließen wir die Eier nochmals 24 Std. bebrüten. Danach wurden die Embryonen durch Kälteexposition (+4°C) abgetötet, die Allantoisflüssigkeiten getrennt steril entnommen, und jede mit dem Hirsttest in der typischen Weise auf ihre haemagglutinatorischen Eigenschaften untersucht.

Kontrolle der Infektiosität:

Zur Kontrolle der Infektiosität der verwendeten Allantoisflüssigkeit beimpften wir ein Kollektiv mit 5 Eiern mit der Flüssigkeit ohne vorhergehende Sterilisation. Der weitere Versuchsverlauf glich jedoch vollkommen dem bereits bei der Inaktivitätskontrolle beschriebenen, d.h. die Eier wurden weitere 24 Std. bebrütet, die Embryonen abgetötet und die Allantoisflüssigkeit nach Hirst getestet. Der positiv ausfallende Hirsttest bewies die Anwesenheit von Haemagglutininen in der Ausgangssuspension.

Prüfung des Temperatureinflusses :

Unser Verfahren arbeitet, wie bereits erwähnt, mit gespanntem Aeto bei geringfügig erhöhter Temperatur.

Um nun sicherzustellen, daß der zu erwartende Effekt, also die Sterilität der Virussuspension durch das Aeto in Verbindung mit der erhöhten Temperatur, nicht jedoch allein durch die Temperaturerhöhung hervorgerufen wurde, prüften wir bei jedem Versuch den Einfluß der Temperatur.

Zu diesem Zwecke wurden 4 Gläser mit je 2,5 ml der verwendeten Allantoisflüssigkeit bei 40°C im Wasserbad gehalten, und zwar je 1 Gläschen 30, 40, 60 und 80 min. lang. 4 weitere Gläschen mit der gleichen Flüssigkeitsmenge setzten wir in ein Wasserbad mit 60°C, ebenfalls wieder 30-80 min.

Anschließend wurde dann die Inaktivitätskontrolle wie bei den übrigen Proben durch Verimpfen auf Bruteier und anschließenden Hirsttest durchgeführt.

Versuchsergebnisse :

Mit dieser Methodik führten wir 3 Versuchsserien durch. Die Ergebnisse unserer Versuche sind in Tab. 7 aufgetragen.

Die Tab. läßt folgendes erkennen:

Sterilisierten wir die Proben bei 40°C 30 min. lang und verimpften sie dann auf Bruteier, so konnten in allen 5 Eiern des beimpften Kollektivs lebende Viren nachgewiesen werden, d.h. also, durch 30 min. langes Sterilisieren bei 40°C konnten die Viren nicht abgetötet werden.

Wurden die Proben dagegen bei der gleichen Temperatur 40 min. und länger sterilisiert, so fiel der Hirsttest bei der Inaktivitätskontrolle negativ

Art des Versuches	Temperatur	Sterilisationsdauer	Eikollektive		
			I	II	III
Sterilisation	40°C	30	+ + + + o	+ + + + +	+ + + + -
		40	- - - - o	- - - - -	- - - - -
		60	- - - - -	- - - - o	- - - - o
		80	- - - - o	- - - - -	- - - - -
	60°C	30	+ + + + +	+ + + - o	+ + + + +
		40	- - - - -	- - - - o	- - - - -
		60	- - - - -	- - - - -	- - - - o
		80	- - - - o	- - - - -	- - - - -
Prüfung des Temperatureinflusses	40°C	40	+ + + + -	+ + + + +	+ + + o o
	60°C	40	+ + + + +	+ + + + o	+ + + + -

Tab.7 : Abtötung von Influenza A mit Aeto bei 5 atü und 40 bzw. 60°C. Prüfung des Temperatureinflusses bei 40 und 60°C.

Zeichenerklärung:

+ = Agglutination von Hühnererythrozyten im Hirsttest = keine Sterilität

- = keine Agglutination von Hühnererythrozyten im Hirsttest = Sterilität

o = Hühnerembryo abgestorben, nicht verwertbar

aus. Diese Zeit genügte also, um die Viren zu vernichten.

Wurden die Proben 40 min. lang im Wasserbad einer Temperatur von 40°C ausgesetzt, so zeigte sich bei der Inaktivitätskontrolle ein positiver Ausfall des Hirsttest, die Viren waren also nicht abgetötet worden. Damit war der Nachweis erbracht, daß nicht die Temperatur, sondern das gespannte Aeto in Verbindung mit der geringfügig erhöhten Temperatur die Keimfreiheit der Allantoisflüssigkeit herbeigeführt hat.

Die Ergebnisse der Versuche unter Erhöhung der Temperatur auf 60°C sind ebenfalls in der Tab. 7 aufgetragen. Wie aus der Tab. hervorgeht, gelang es uns trotz Erhöhung der Temperatur nicht, die zur Vernichtung der Viren erforderliche Sterilisationsdauer wesentlich zu verkürzen. Die Proben nämlich, die wir nur 30 min lang sterilisierten, erwiesen sich bei der Inaktivitätskontrolle wiederum als unsteril. Sterilisierten wir dagegen 40, 60 und 80 min lang, so wurden sämtliche Influenzaviren abgetötet: die beimpften Bruteier blieben steril. Die Ergebnisse der Sterilisationsversuche bei 60°C gleichen also den bei 40°C gewonnenen. Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, daß die Temperaturerhöhung eine Verkürzung der Sterilisationsdauer um weniger als 10 min. hervorruft, daß also bei 40°C z. B. 38, bei 60°C aber nur 34 min. erforderlich sind.

Auch mit 60°C testeten wir den Einfluß der Temperatur in der beschriebenen Weise. Die Ergebnisse stimmen ebenfalls mit denen der Prüfung mit 40°C überein. Durch 40 min. langen Aufenthalt in einem Wasserbad von 60°C ließ sich die Lebensfähigkeit der Viren nicht wesentlich beeinflussen.

Die Kontrolle der Infektiosität erbrachte bei allen Versuchen den Nachweis lebender Viren.

Versuche mit EMC-Viren :

Prinzip der Versuche :

Als infektiöses Agens diente uns bei diesen Versuchen eine Aufschwemmung homogenisierter Gehirne von Mäusen, die an einer Infektion mit EMC-Viren verwendet waren.

Proben dieser Suspension wurden bei 40 und 60°C 30, 40, 60 und 80 min lang sterilisiert. Die Inaktivitätskontrolle erfolgte durch intracerebrale Verimpfung auf Mäuse. Von jeder Probe wurde ein Kollektiv mit 7 Mäusen beimpft.

Die Prüfung des Temperatureinflusses wurde in ähnlicher Weise durchgeführt wie bei den Influenzaviren, d.h., 2 Proben wurden bei 40 bzw. 60°C 40 min lang im Wasserbad gehalten und anschließend wie die übrigen Proben intracerebral auf Mäuse verimpft.

Im einzelnen wurde methodisch folgendermaßen vorgegangen:

Versuchstiere:

Als Versuchstiere dienten weiße Mäuse, die einer einheitlichen Zucht entstammten. Die Tiere wogen durchschnittlich 18-20 g. Jedes Tierkollektiv mit 7 Tieren wurde in einem gläsernen Käfig untergebracht. Die Raumtemperatur des Stalles (23°C), die Luftfeuchtigkeit (ca. 50%) sowie Fütterung und Haltung der Tiere entsprachen den von DÖTTL (22) als optimal für die Züchtung von Mäusen angegebenen Bedingungen.

Herstellung der Virussuspension :

Als infektiöses Agens diente ein EMC-Stamm, der in unserem Institut als Passagestamm gehalten wurde.

Zu Beginn des Versuches wurden mit diesem Stamm 3 Mäuse intracerebral beimpft (Technik s. Inaktivitätskontrolle). Nach 48 Std. narkotisierten wir die Tiere und entbluteten sie durch Öffnen der Halsschlagader. Anschließend wurden die Gehirne steril entnommen und in einen sterilen Schüttelkolben eingebracht.

Ein Gehirn wiegt etwa 0,3 g. Um eine Verdünnung der Suspension auf etwa 1:10 zu erhalten, setzten wir den 3 Gehirnen 8,1 ml physiologische Kochsalzlösung zu. Dann wurden die Gehirne durch Schütteln des Kolbens homogenisiert.

Die Zell-Virussuspension, die wir auf diese Weise erhielten, zentrifugierten wir anschließend 10 min. lang bei 1000 U/min, dekantierten den Überstand und verdünnten ihn weiter auf 1:100.

Sterilisationsversuche :

Die Sterilisationsversuche wurden in ähnlicher Weise wie bei den Influenzaviren durchgeführt.

8 Gefüße von 3,6 cm Durchmesser wurden 1 cm hoch mit der Virussuspension gefüllt. Sie enthielten dann etwa 10 ml.

4 Proben wurden unter den üblichen Bedingungen, 40°C und 5 atü, sterilisiert, je eine Probe 30, 40, 60 und 80 min. lang. Bei den restlichen 4 Proben erhöhten wir die Temperatur bei gleichbleibendem Druck auf 60°C und sterilisierten ebenfalls 30-80 min. lang.

Inaktivitätskontrolle :

Die Inaktivitätskontrolle im Anschluß an die Sterilisationsversuche erfolgte durch intracerebrale Verimpfung auf weiße Mäuse. Zucht, Auswahl und Haltung der Mäuse wurden bereits beschrieben.

Von jeder sterilisierten Probe wurde ein Kollektiv von 7 Tieren beimpft. Die Tiere erhielten für die Zeit der Injektion einen kurzen Atherrausch. Danach injizierten wir mit einer Tuberkulinspritze 0,05 ml der Probe an einer Stelle, die etwa in der Mitte der Verbindungslinie Orbita - äußerer Rand des Gehörganges lag.

Bei dieser Art der Injektion bleibt das Versuchstrauma gering, und die Tiere erholen sich rasch (17).

Im Anschluß an die Injektion setzten wir die Tiere wieder in ihre Käfige und kontrollierten sie während der nächsten 21 Tage 2 x täglich. Bei jeder Kontrolle sonderten wir die verendeten Tiere aus.

Da wir die Virussuspension gegenüber dem Ausgangsmaterial nur im Verhältnis 1 : 100 verdünnten, kann mit einer hohen Keimkonzentration in der Suspension gerechnet werden. Das verkürzt die Überlebenszeit der infizierten Tiere. Auch wird sich bei einer hohen Keimkonzentration ein individueller Unterschied in der Empfindlichkeit der Tiere gegenüber den Erregern weniger stark auswirken können, wodurch der Versuch an Genauigkeit gewinnt (17).

Kontrolle der Infektiosität :

Die Infektiosität kontrollierten wir in der üblichen Weise durch Verimpfung der Keimsuspension ohne vorhergehende Sterilisation bzw. Hitzeexposition auf ein Kollektiv von 7 Tieren. Haltung und Beobachtung dieser Tiere erfolgten in der gleichen Weise wie bei der Inaktivitätskontrolle.

Prüfung des Temperatureinflusses :

Auch bei den Versuchen mit dem EMC-Virus kontrollierten wir den Einfluß der Temperatur auf die Überlebenszeit der Viren.

Ebenso wie bei den Influenzaviren wurden 2 Proben 40 min bei 40 und 60°C im Wasserbad gehalten. Jede Probe wurde dann wie bei der Inaktivitätskontrolle verimpft.

Versuchsergebnisse:

Mit dieser Methodik führten wir 3 Versuchsserien durch. Das Ergebnis einer Serie haben wir in Tab. 8 dargestellt.

Teil 1 dieser Tab. zeigt die Ergebnisse der Sterilisation bei 40°C und 5 atü. Rechts neben der Angabe der Sterilisationsdauer sind die Ordnungsnummern der Tiere des Kollektivs eingetragen. Für jedes verendete Tier haben wir den freien Raum rechts von der Ordnungszahl durch eine waagerechte schraffierte Säule vom Tage des Todes an ausgefüllt. Freier weißer Raum bedeutet also Überleben der Tiere.

Der Teil der Keimsuspension, der 30 min. lang sterilisiert worden war, rief bei seiner Verimpfung den Tod der Tiere hervor. Sämtliche Mäuse dieses Kollektivs verstarben innerhalb der ersten 96 Std. unter den typischen Lähmungserscheinungen. Die Viren waren also durch das Aeto noch nicht abgetötet worden.

Sterilisierten wir dagegen 40 min., so führte die Verimpfung innerhalb der 21 tägigen Beobachtungszeit bei keinem der Tiere zum Tode bzw. zu Krankheitserscheinungen. Nur 1 Tier dieser Gruppe verendete nach 8 Tagen ohne Lähmungserscheinungen. Bei der Sektion konnte keine Todesursache gefunden werden. Die Sterilisationsdauer von 40 min. hatte offensichtlich genügt, um sämtliche Viren abzutöten. Dementsprechend waren auch die 60 und 80 min. lang sterilisierten Proben keimfrei, denn keines der Tiere, die mit diesen Proben beimpft worden waren, verstarb während der Beobachtungszeit.

STERILISATIONSDAUER IN MIN.		ÜBERLEBENSZEIT DER TIERE (ANGABE IN TAGEN)												
		$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	$2\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$	4	$4\frac{1}{2}$	5	10	15	21
30	7													
	6													
	5													
	4													
	3													
	2													
	1													
40	7													
	6													
	5													
	4													
	3													
	2													
	1													
60	7													
	6													
	5													
	4													
	3													
	2													
	1													
80	7													
	6													
	5													
	4													
	3													
	2													
	1													
FRÜH DES TEMPERAT-EIN- FLUSSES BEI 40°/40 MIN.	7													
	6													
	5													
	4													
	3													
	2													
	1													

Tab.8,1.Teil: Versuche zur Abtötung von EMC-Viren
mit Aeto bei 5 atü und 40°C.
Zeichenerklärung s.Text S.39

STERILISATIONS- DAUER IN MIN.		ÜBERLEBENSZEIT DER TIERE (ANGABE IN TAGEN)												
		$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	$2\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$	4	$4\frac{1}{2}$	5	10	15	21
30	7													
	6													
	5													
	4													
	3													
	2													
	1													
40	7													
	6													
	5													
	4													
	3													
	2													
	1													
60	7													
	6													
	5													
	4													
	3													
	2													
	1													
80	7													
	6													
	5													
	4													
	3													
	2													
	1													
PRÜFG. DES TEMP.-EINFL. BEI $60\frac{1}{4}$ MIN.	7													
	6													
	5													
	4													
	3													
	2													
	1													

Tab.8,2.Teil: Versuche zur Abtötung von EMC-Viren mit Aeto bei 5 atü und 60°C
Zeichenerklärung s. Text S.39

Durch eine Erhöhung der Temperatur von 40 auf 60°C hofften wir, die Sterilisationsdauer wesentlich verkürzen zu können. Das gelang uns jedoch nicht, wie aus Teil 2 der Tab. 8 hervorgeht. Sterilisierten wir nämlich 40 - 80 min. lang, so verstarb kein Tier während der Inaktivitätskontrolle. Die Verimpfung derjenigen Probe dagegen, die wir nur 30 min. lang sterilisiert hatten, rief bei allen Tieren des Kollektivs innerhalb von 96 Std. nach der Injektion den Tod unter typischen Lähmungserscheinungen hervor. Eine Verkürzung der Sterilisationsdauer durch Erhöhung der Sterilisationstemperatur ließ sich also auch bei den WAC-Viren nicht erreichen. Dabei muß aber wieder bemerkt werden, daß eine Verkürzung um weniger als 10 min. durch unsere Versuche nicht erfaßt werden konnte.

Wir wollten nun auch bei diesen Viren den Einfluß der Temperatur von 40 bzw. 60°C auf die Überlebenszeit der Keime prüfen. Zu diesem Zwecke führten wir Versuche in der bereits angegebenen Weise durch. Die Ergebnisse der Versuche mit 40°C sind in Teil 1, die der Versuche mit 60°C in Teil 2 der Tab. 8 aufgetragen. Sie bestätigen die bereits im Zusammenhang mit den Influenzaviren gemachte Aussage, daß nur das Aeto in Verbindung mit der erhöhten Temperatur die Viren abzutöten vermag, während die alleinige Anwendung von 40 bzw. 60°C über eine gleichlange Zeit ohne Einfluß auf die Viren bleibt. Ließen wir nämlich die Suspension 40 min. bei 40°C im Wasserbad und verimpften sie dann einem Tierkollektiv, so verstarben alle Tiere innerhalb von 4 Tagen unter den typischen Lähmungs-

erscheinungen. Selbst 60°C vermochten die Virulenz der Erreger nicht wesentlich herabzusetzen, wenn wir sie 40 min. lang einwirken ließen. Alle Tiere des Kollektivs, das wir mit dieser Probe beimpften, verstarben ebenfalls innerhalb von 96 Std. unter den typischen Lähmungserscheinungen.

Bei der Kontrolle der Infektiosität verwendeten 6 der Tiere zwischen dem 3. und 4. Tag unter Lähmungserscheinungen. 1 Tier verstarb bereits innerhalb der ersten 12 Std. Die Sektion ergab ein Lungenödem sowie eine ausgedehnte Hirnblutung, so daß der Tod wohl als Folge des Versuchstraumas besonders schnell erfolgte.

Versuche mit Theilerviren :

Die Theilerviren sind ebenso wie die EMC-Viren ausgesprochen neurotrop.

GÖNNERT und BOCK (11,36) hatten festgestellt, daß die Resistenz dieser Viren gegen chemische und physikalische Einflüsse etwa in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Poliomyelitisvirus, dessen Vernichtung durch ein Entkeimungsverfahren unbedingt gewährleistet werden muß. Das nur wenig menschenpathogene Theilervirus eignet sich daher in vergleichenden Versuchen als Modell anstelle des hochvirulenten Poliomyelitisvirus.

Auch wir führten daher unsere Versuche mit dem Theilervirus durch.

Die Herstellung der Keimsuspension, die Kontrolle der Infektiosität und der Inaktivität sowie die Prüfung des Temperatureinflusses erfolgten in der gleichen Weise wie bei den EMC-Viren. Auch der Modus der Sterilisation war demjenigen des EMC-Virus gleich.

Wie bei den übrigen Viren führten wir auch mit

diesem Keim 3 Versuchsserien durch. Das Ergebnis der letzten Serie haben wir in Tab. 9 zusammengefaßt.

Teil 1 dieser Tab. zeigt die Sterilisationsversuche bei 40°C.

Die Verimpfung der Probe, die nur 30 min. sterilisiert wurde, führte bei der Inaktivitätskontrolle den Tod aller Tiere innerhalb von 86 Std. herbei.

Verlängerten wir dagegen die Sterilisationsdauer auf 40 min. bei gleichbleibendem Druck und gleicher Temperatur, so überlebten alle Tiere die Beimpfung. Kein Tier verstarb innerhalb der Beobachtungszeit. Die 40 min. lange Einwirkung des Aeto unter den genannten Bedingungen hatte offensichtlich genügt, um sämtliche Viren zu vernichten.

Selbstverständlich erwiesen sich auch die Proben, die 60 und 80 min. sterilisiert worden waren, als keimfrei.

Ein ähnliches Ergebnis zeigten die Versuche bei Erhöhung der Temperatur auf 60°C. Wie aus Teil 2 der Tab. hervorgeht, waren ebenfalls 40 min. erforderlich, um eine Sterilität der Suspension zu erreichen.

Die Verimpfung der Probe, die nur 30 min. lang dem Aeto ausgesetzt worden war, führte innerhalb von 84 Std. den Tod der Tiere unter Lähmungserscheinungen herbei.

Die Erhöhung der Temperatur um 20°C bewirkte also keine Beschleunigung des Sterilisationsvorganges, es sei denn, der Unterschied sei kürzer als 10 min.

Auch die Prüfung des Einflusses der Temperatur brachte die gleichen Ergebnisse wie bei den Influenza- und den EMC-Viren. Die Einwirkung von 40 bzw. 60°C über 40 min. hatte keine erkennbare Veränderung zur Folge.

STERILISATIONS- DAUER IN MINUTEN		ÜBERLEBENSZEIT DER TIERE (ANGABE IN TAGEN)													
		$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	$2\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$	4	$4\frac{1}{2}$	5	10	15	21	
30	7														
	6														
	5														
	4														
	3														
	2														
	1														
40															
60															
80															
PRÜFUNG DES TEMP. EINFL. BEI 40°/40MIN															

Tab.9, Teil 1 : Versuche zur Abtötung von Theiler-
viren mit Aeto bei 5 atü und 40°C
Zeichenerklärung s.S.39

STERILISAT.- DAUER IN MINUTEN	ÜBERLEBENSZEIT DER TIERE (ANGABE IN TAGEN)												
	$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	$2\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$	4	$4\frac{1}{2}$	5	10	15	21
30	7												
	6												
	5												
	4												
	3												
	2												
	1												
40													
60													
80													
TRÜFG. DES TEMP.-EINFL. B. 60°/40M													

Tab.9, Teil 2 : Versuche zur Abtötung von Theiler-
viren mit Aeto bei 5 atü und 60°C
Zeichenerklärung s. Text S.39

Bei der Kontrolle der Infektiosität verwendeten alle Tiere, denen wir zu diesem Zweck die Suspension in ihrer ursprünglichen Form, also ohne vorhergehende Hitzeexposition bzw. Einwirkung des Aeto, verimpft hatten, innerhalb von 84 Std. unter den typischen Lähmungserscheinungen. Der erforderliche Nachweis der Infektiosität der Suspension war damit erbracht.

Versuche mit Herpesviren :

Als letzten Keim zogen wir das Herpesvirus in unsere Versuche ein, das ebenso wie das Theiler- und EMC - Virus neurotrop, daneben aber auch dermatotrop ist. Diese Viren können daher entweder auf Chorionallantoismembranen oder in Gehirnen von Versuchstieren zur Vermehrung gebracht werden. Wir benutzten zur Herstellung der Virussuspension die letztere Möglichkeit.

Die Technik der Herstellung war gleich der bei den EMC- und Theilerviren, ebenso auch die Inaktivitätskontrolle, die Prüfung des Temperatureinflusses, die Kontrolle der Infektiosität sowie die Durchführung der Sterilisation.

Wir führten wiederum 3 Versuchsserien durch. Das Ergebnis einer Serie haben wir in Tab. 10 zusammenfassend dargestellt.

Die Ergebnisse der Sterilisation bei 40°C sind in Teil 1 dieser Tab. zusammengestellt. Sie gleichen denen, die wir bei den vorausgegangenen Versuchen mit Viren erzielt hatten. - Nach 30 min. langem

STERILISAT- DAUER IN MINUTEN		ÜBERLEBENSZEIT DER TIERE (ANGABE IN TAGEN)													
		$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	$2\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$	4	$4\frac{1}{2}$	5	10	15	21	
30	7														
	6														
	5														
	4														
	3														
	2														
	1														
40															
60															
80															
PRÜFUNG DES TEMPERATUREIN- FLUSSES BEI 40°/40M															

Tab.10, Teil 1 : Versuche zur Abtötung von Herpes-
viren mit Aeto bei 5 atü und 40°C
Zeichenerklärung s.Text S.39

STERILISAT. DAUER IN MINUTEN		ÜBERLEBENSZEIT DER TIERE (ANGABE IN TAGEN)												
		$\frac{1}{2}$	1	$1\frac{1}{2}$	2	$2\frac{1}{2}$	3	$3\frac{1}{2}$	4	$4\frac{1}{2}$	5	10	15	21
30	7													
	6													
	5													
	4													
	3													
	2													
	1													
40														
60														
80														
PRÜF. DES TEMP. EINFL. BEI 60°/40														

Tab.10, Teil 2 : Versuche zur Abtötung von Herpes-
viren mit Aeto bei 5 atü und 60°C
Zeichenerklärung s.Text S.39

Sterilisieren überlebte kein Tier die Inaktivitätskontrolle. Alle Tiere verstarben innerhalb von 84 Std. nach der Injektion unter typischen Krankheitserscheinungen.

Sterilisierten wir dagegen 40 min. lang, so rief die Suspension bei keinem Tier den Tod oder Krankheitserscheinungen hervor, sie war also steril.

Die Sterilisation bei 60°C führte ebenfalls erst nach 40 min. zur Keimfreiheit der Keimaufschwemmung. Die Probe, die wir nur 30 min. dem Aeto ausgesetzt hatten, führte bei der Inaktivitätskontrolle zum Tode aller Tiere dieses Kollektivs. Die Verimpfung der Proben, die 40, 60 und 80 min. sterilisiert worden waren, wurde dagegen von allen Tieren beschwerdefrei überstanden (Teil 2 der Tab. 10).

Die Ergebnisse des Temperatureinflusses auf die Viren sind jeweils in der unteren Spalte von Teil 1 und 2 der Tab. 10 eingetragen. Sie bestätigen wiederum die Erfahrungen, die wir bereits bei den übrigen Viren machten. Verimpften wir die Proben, die 40 min. lang bei 40 und 60°C im Wasserbad gehalten worden waren, auf ein Mäusekollektiv, so verendeten alle Tiere innerhalb von 84 Std. Die Temperatureinwirkung blieb also ohne Einfluß auf die Viren.

Bei der Kontrolle der Infektiosität verendeten alle Mäuse des beimpften Kollektivs innerhalb von 4 Tagen unter den typischen Lähmungserscheinungen. Der erforderliche Nachweis der Anwesenheit lebender Erreger in der Ausgangssuspension war damit erbracht.

Einfluß der Flüssigkeitsmenge und der Höhe der Flüssigkeitssäule auf die Sterilisationsdauer

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, daß die bei der Sterilisation von Trockenkulturen gewonnenen Erfahrungen bei der Sterilisation von Flüssigkeiten nur in beschränktem Maße gelten. Das gilt besonders für gasförmige Sterilisatoren, zu denen auch das Aeto zählt. Während das Gas bei Trockenkulturen verhältnismäßig einfach zu den Keimen gelangen kann, muß es bei der Sterilisation infizierter Flüssigkeiten erst die gesamte Flüssigkeit durchdringen, bevor seine volle sterilisierende Wirkung einsetzen kann. Die erforderliche Sterilisationszeit für Flüssigkeiten verlängert sich also gegenüber der Sterilisationsdauer von Trockenkulturen um die Zeit, die zur Erreichung einer bestimmten Aetokonzentration in der Flüssigkeit erforderlich ist.

Bei Verwendung offener Gefäße aus weitgehend gasundurchlässigem Material, z. B. Glas, tritt das Gas über die Oberfläche in die Flüssigkeit ein. Bei gleichbleibendem Druck dringt in der Zeiteinheit pro mm^2 Oberfläche stets eine gleiche Menge Gas ein. Unter der Voraussetzung, daß eine genügende Menge Gas zur Verfügung steht, müßte das Gas daher in 2 gleich hoch gefüllten zylindrischen Gefäßen verschiedenen Durchmessers in derselben Zeit von der Oberfläche bis zum Boden vordringen und auch gleichzeitig die zur Sterilisation erforderliche Konzentration erreichen.

In dem Gefäß mit dem größeren Durchmesser wäre dann aber bei gleicher Sterilisationsdauer eine viel größere Flüssigkeitsmenge sterilisiert. Aus diesen theoretischen Überlegungen heraus müßte es also am günstigsten sein, möglichst weite Gefäße flach mit Flüssigkeit zu füllen. Für Gefäße aus gasdurchlässigem Material, z.B. Kunststoff, oder gewölbte und konische Gefäße gilt das nicht in dem gleichen Ausmaß. Eine weitere Einschränkung muß für die Sterilisation sehr großer Flüssigkeitsmengen gemacht werden, weil die zur Erwärmung erforderliche Zeit verlängert wird.

Diese theoretischen Erwägungen sollten in den nachfolgenden Versuchen praktisch nachgeprüft werden.

Als Testkeim für diese Untersuchungen verwendeten wir *S. paratyphi B*. Die Herstellung der Keimsuspension, die Kontrolle der Inaktivität sowie der Infektiosität entsprechen den auf S. 16-19 gemachten Angaben.

Wir verwendeten zylindrische Gefäße etwa gleicher Wandstärke, um die Wärmeübergangszahl möglichst gleich, und damit die Unterschiede in der Erwärmung möglichst gering zu halten.

Nachstehend sind die Durchmesser der Gefäße und die Flüssigkeitsmenge angegeben, die sie enthielten, wenn wir sie 1 cm hoch anfüllten.

Die Sterilisation erfolgte bei 40°C und 5 atü.

Röhrchen	a.)	Durchmesser	=	2,5 mm,	Inhalt	0,05 ml
"	b.)	"	=	6,7 mm,	"	0,35 ml
"	c.)	"	=	9,5 mm	"	0,7 ml
"	d.)	"	=	25,0 mm	"	4,9 ml
"	e.)	"	=	48,0 mm	"	18,8 ml
"	f.)	"	=	55,0 mm	"	23,0 ml

Methodisch wurde folgendermaßen vorgegangen :

Die Gefäße wurden gleich hoch, zunächst 1 cm, mit der Keimaufschwemmung angefüllt, alle gleichzeitig in den Druckkasten des Sterilisationsapparates eingebracht und zunächst 20 min lang sterilisiert. Danach wurde von jedem Gefäß 1 Nähragarplatte sowie ein Bouillonröhrchen beimpft.

Den gleichen Vorgang wiederholten wir mit einer Sterilisationsdauer von 25, 30, 35 min usw. bis zu 70 min. Nach jeder Sterilisation wurde die Suspension in den Röhrchen erneuert.

Auf diese Weise konnte für jedes Gefäß die Sterilisationsdauer für eine 1 cm hohe Füllung ermittelt werden.

Im Anschluß an diese Versuche wurden die Gefäße stufenweise im Abstand von 1 cm höher angefüllt bis zu einer Höhe von 12 cm, und für jede Höhe in der oben angegebenen Weise die erforderliche Sterilisationsdauer ermittelt.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tab. 11 zusammengestellt.

Betrachten wir zunächst die 1. waagerechte Spalte! Die Gefäße sind 1 cm hoch gefüllt, das dünnste Röhrchen enthält also 0,05, das dickste dagegen 23,0 ml.

Sterilisierten wir 20 und 25 min lang, so erwies sich bei der Inaktivitätskontrolle keine der Pro-

		Sterilisationsdauer in Minuten									
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	70
1 cm	a	+	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	b	+	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	c	+	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	d	+	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	e	+	+	-	-	-	-	0	0	0	0
	f	+	+	-	-	-	-	0	0	0	0
2 cm	a	+	+	+	-	-	-	0	0	0	0
	b	+	+	+	-	-	-	0	0	0	0
	c	+	+	+	-	-	-	0	0	0	0
	d	+	+	+	-	-	-	0	0	0	0
	e	+	+	+	-	-	-	0	0	0	0
	f	+	+	+	-	-	-	0	0	0	0
3 cm	a	+	+	+	+	-	-	-	0	0	0
	b	+	+	+	-	-	-	-	0	0	0
	c	+	+	+	-	-	-	-	0	0	0
	d	+	+	+	-	-	-	-	0	0	0
	e	+	+	+	-	-	-	-	0	0	0
	f	+	+	+	-	-	-	-	0	0	0
4 cm	a	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0
	b	+	+	+	-	-	-	-	-	0	0
	c	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0
	d	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0
	e	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0
	f	+	+	+	-	-	-	-	-	0	0
5 cm	a	+	+	+	+	+	-	-	-	0	0
	b	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0
	c	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0
	d	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0
	e	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0
	f	+	+	+	+	-	-	-	-	0	0

Tab.11, Teil 1 :Legende s.Text S.53

Höhe	Gr.	Sterilisationsdauer in Minuten									
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	70
6 cm	a	+	+	+	+	+	-	-	-	-	o
	b	+	+	+	+	+	-	-	-	-	o
	c	+	+	+	+	+	-	-	-	-	o
	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	o
	e	+	+	+	+	+	-	-	-	-	o
	f	+	+	+	+	+	-	-	-	-	o
7 cm	a	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	b	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	c	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	e	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	f	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
8 cm	a	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	b	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	c	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	e	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	f	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
10 cm	a	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	b	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	c	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
11 cm	a	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	b	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	c	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Tab. 11, Teil 2: Legende s. Text, Zeichenerklärung:
 + = Wachstum in Subk., - = kein Wachstum in S.
 o = nicht getestet

ben bei der Inaktivitätskontrolle als steril. 30 min. dagegen genügten, um sämtliche Keime abzutöten; bei der Inaktivitätskontrolle konnte daher in den Subkulturen ein Keimwachstum nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Sterilität trat also in allen Röhrchen gleichzeitig ein trotz der stark unterschiedlichen Flüssigkeitsmenge.

Anschließend füllten wir die Gefäße 2 cm hoch an. Diesmal mußten wir 30 min. lang sterilisieren, bevor alle Keime vernichtet waren. Dabei muß wiederum hervorgehoben werden, daß die Sterilität gleichzeitig in allen Röhrchen eintrat.

Eine gleichhohe Füllung der Gefäße verlangt demnach unabhängig von der Flüssigkeitsmenge eine gleiche Sterilisationsdauer.

Andererseits erfordert die gleiche Flüssigkeitsmenge eine unterschiedliche Sterilisationsdauer, je nachdem, ob wir sie flach in ein weites, oder hoch in ein enges Röhrchen füllen. Als Beispiel mag folgendes dienen:

0,7 ml kann man in Röhrchen c.) füllen, dessen Boden dann ein cm hoch bedeckt ist. Hierfür ist eine Sterilisationsdauer von 30 min. erforderlich. Gießen wir dagegen die gleiche Menge in Röhrchen b.), so ist dieses 2 cm hoch gefüllt. Zu seiner Sterilisation werden daher 35 min. benötigt.

Prinzipiell kann daher gesagt werden, daß die Flüssigkeiten dann am schnellsten steril werden, wenn man sie möglichst flach in ein möglichst weites Gefäß einfüllt.

In Fortführung der Versuche füllten wir sodann die Gefäße 3 cm hoch mit der Suspension an. Wie aus der

Tab.11 hervorgeht,bedingte diese Erhöhung keine Verlängerung der Sterilisationsdauer.Die Suspensionen waren nach 35 min steril.

Dazu muß jedoch einschränkend bemerkt werden,daß eine Verlängerung um weniger als 5 min bei unseren Versuchen nicht erfaßt werden kann.

Füllten wir die Gefäße dagegen 4 bzw.5 cm hoch mit der Suspension an,so mußten wir 40 min.lang sterilisieren,bevor die Subkulturen steril blieben. Bei der in Tab.11 dargestellten Versuchsserie war eins der 5 cm hoch gefüllten Röhrchen sogar erst nach 45 min.steril.Die übrigen Versuchsserien zeigten jedoch für 5 cm eine einheitliche Sterilisationsdauer von 40 min.

Eine weitere Füllung der Gefäße auf 6-8 cm Höhe verlängerte die Sterilisationsdauer auf 45 min. Die Sterilisationsdauer war aber wiederum für alle Gefäße gleich lang.Lediglich 1 Röhrchen mit einer Füllung von 7 cm und eines mit 8 cm zeigten eine geringe Abweichung von diesem Wert.

Die weitere Steigerung der Flüssigkeitshöhe stieß leider auf technische Schwierigkeiten,die dadurch bedingt waren,daß die Höhe unseres Sterilisationsapparates das Einbringen höherer Gefäße nicht gestattete.Die lichte Höhe des Druckkastens betrug nur 10 cm.Der am Boden angebrachte Schwamm,der die zur Sterilisation erforderliche Feuchtigkeit lieferte,verringerte die Höhe auf 9 cm.Die Röhrchen, die 9 cm und länger waren,mußten daher schräg in den Druckkasten eingebracht werden.Das gelang jedoch nur bei den Röhrchen a-c.).Wir haben daher, nur um einen ungefähren Überblick zu gewinnen,

diese Gefäße 10 und 12 cm hoch angefüllt. Für 10 cm waren dabei 50, für 12 cm 55 min erforderlich. Die Ergebnisse für diese beiden Flüssigkeitshöhen differierten jedoch in allen Versuchsserien.

Die größte Menge an Flüssigkeit, die wir sterilisierten, betrug 184,0 ml.

Die Abb. 4 stellt eine Zusammenfassung der Tab. 11 dar. Sie erlaubt einen schnellen Überblick darüber, welche Zeitdauer zur Sterilisation einer bestimmten Flüssigkeitsmenge erforderlich ist.

Auf der Abszisse ist die Höhe der Füllung und darunter die erforderliche Sterilisationsdauer aufgetragen. Die Ordinate gibt die Flüssigkeitsmenge an.

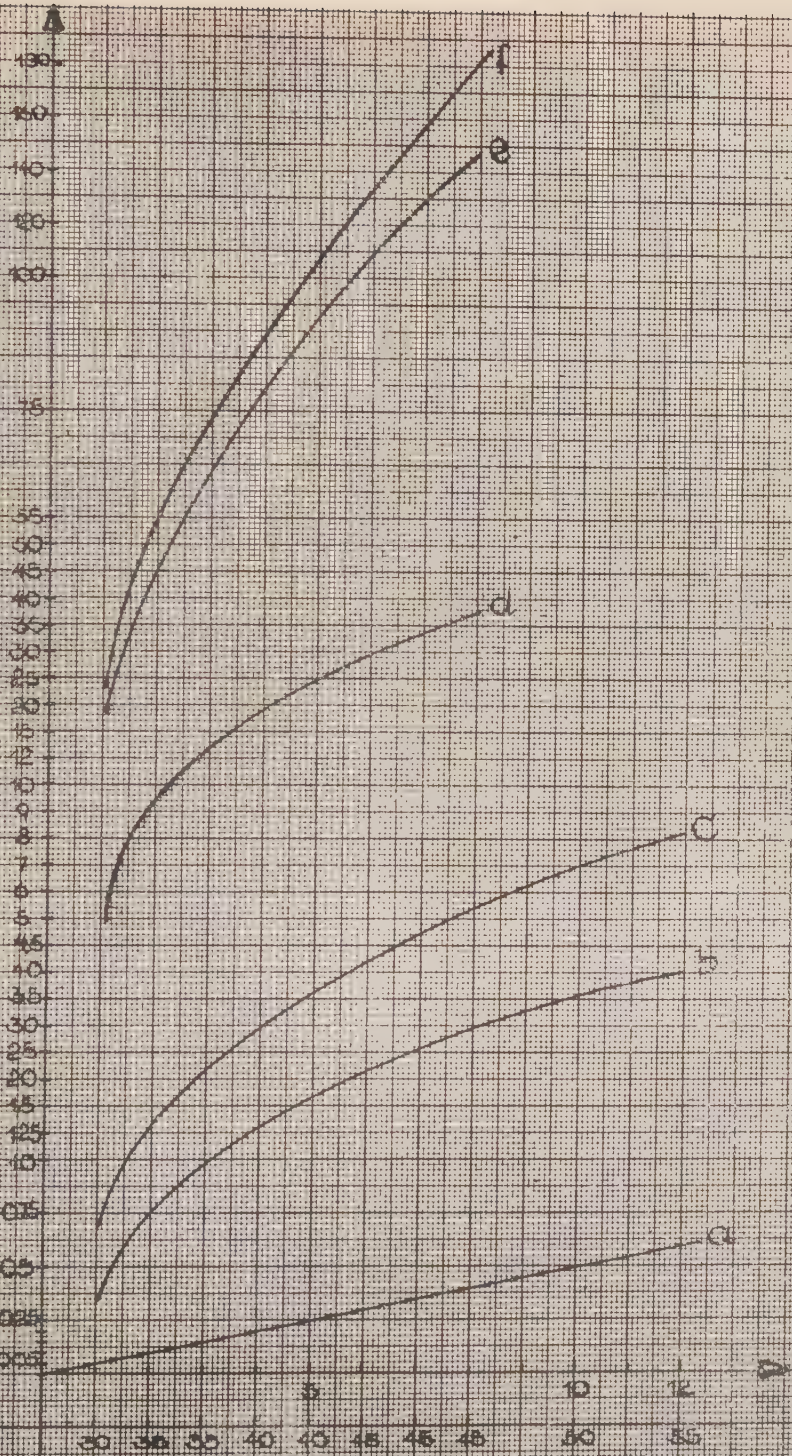
Suchen wir also die Sterilisationsdauer für z. B. 0,7 ml auf. Wir legen zu diesem Zweck eine Waage-rechte durch den Punkt 0,7 der Ordinate. Sie schneidet die Kurven b und c. Von beiden Schnittpunkten füllen wir das Lot auf die Abszisse.

Das erste Lot, von der Kurve c ausgehend, trifft die Abszisse beim Punkt 1, das Röhrchen c müßte also 1 cm hoch gefüllt werden. Darunter steht die Sterilisationsdauer : 30 min.

Das 2. Lot, von der Kurve b ausgehend, trifft die Abszisse am Punkt 2. Das Röhrchen b müßte also 2 cm hoch gefüllt werden, wofür eine Sterilisationsdauer von 35 min. erforderlich ist.

Alle diese Werte gelten jedoch nur für die *S. paratyphi* B. Unter Verwendung anderer Keime hätte sich grundsätzlich die gleiche Abhängigkeit ergeben.

Es verändert sich nur der Ausgangspunkt. Gefäß c.), 1 cm hoch mit einer Suspension von *B. cereus* gefüllt, müßte gemäß Abb. 3 40 min lang sterilisiert werden. 12 cm würden dann 65 min erfordern.



Suspendierung der Keime in verschiedenen Medien :

Die Suspendierung von Keimen in Serum, eiweiß- bzw. kohlehydrathaltigen Flüssigkeiten führt bei den meisten chemischen Methoden der Entkeimung zu einer Verlängerung der Sterilisationsdauer. Schon bei den ersten Sterilisationsversuchen mit Aeto konnten jedoch WILSON und GINSBERG (34) nachweisen, daß dies beim Aeto nicht der Fall ist. Da diese Verfasser ihre Versuche jedoch mit flüssigem Aeto durchgeführt hatten, wollten wir sie mit gasförmigem Aeto nachprüfen.

Andererseits hatten LAMMERS und GEWALT (69) festgestellt, daß bei der Anwesenheit konzentrierter Salzlösungen in der Druckkammer eine Verlängerung der Sterilisationsdauer eintritt. Sie suchten diese Tatsache durch eine Bindung des Aeto an das Salz zu erklären. Wir wollten nun prüfen, ob auch eine Suspendierung der Keime in Salzlösungen eine Verlängerung der Sterilisationsdauer bewirkt.

Als Testkeim diente wiederum *S. paratyphi* B. Wir suspendierten diesen Keim in konz. Serum, physiologischer Kochsalzlösung, Aqua destillata und 3%iger NaCl-Lösung.

Herstellung der Suspensionen :

9 Bouillonkulturen von *S. paratyphi* B wurden zentrifugiert, dekantiert, der Bodensatz mit Aqua dest. aufgeschwemmt und erneut zentrifugiert. Diesen Vorgang wiederholten wir 3 mal, um die Keime möglichst weitgehend von Nährbodenresten zu reinigen.

Nach dem letzten Dekantieren wurde der Bodensatz von je 2 Kulturen mit 5 ml der jeweiligen Suspensionsflüssigkeit aufgeschwemmt. Die letzte Kultur diente als Kontrolle.

Versuche :

Mit diesen Suspensionen füllten wir jeweils 1 Röhrchen der Größe c.) 1 cm hoch an. Anschließend bestimmten wir in der üblichen Weise die zur Erreichung der Keimfreiheit erforderliche Zeit. Die Ergebnisse haben wir in Tab.12 zusammengestellt. Wie aus der Tab. hervorgeht, war die Sterilisationsdauer bei allen Proben trotz des unterschiedlichen Mediums gleich. Vor allem bedingte die Suspendierung in Serum keine Verlängerung der Sterilisationsdauer, es sei denn, sie wäre geringer als 5 min.

Trägerflüssigkeit	Sterilisationsdauer in Minut.					
	20	25	30	35	40	45
Aqua destillata	+	+	-	-	-	-
physiol. NaCl-Lös.	+	+	-	-	-	-
3%ige NaCl-Lös.	+	+	-	-	-	-
Serum	+	+	-	-	-	-

Tab.12 : Sterilisation von S.parat.B bei Suspendierung in verschiedenen Trägerflüssigkeiten. Zeichenerklärung:
+ = Wachstum in Subkult., - = kein Wachst.

Verhalten der immunisierenden Eigenschaften von S.paratyphi B bei Sterilisation mit Aeto :

Bei der Herstellung von Vaccinen ist es wichtig, daß zwar die pathogenen Eigenschaften der Keime beseitigt werden, die antigene Wirkung und damit die immunisierenden Eigenschaften dagegen erhalten bleiben. Auf Grund früherer Versuche war die Ansicht vertreten worden, daß das Aeto die immunisierenden Eigenschaften nicht beeinträchtigt (67). Diese Tatsache sollte nochmals nachgeprüft werden.

Versuchsanordnung :

Als Testkeim verwendeten wir wiederum S.parat.B. Als Versuchstiere dienten Kaninchen. Es wurden 6 männliche Tiere ausgewählt, die ein Ausgangsgewicht um etwa 1,5 kg besaßen. 3 Tiere wurden mit einer in der üblichen Weise hergestellten Vaccine beimpft, die 3 übrigen erhielten Injektionen einer Suspension von S.parat.B, die mit Aeto sterilisiert worden war.

Herstellung der Vaccine :

Jeweils 2 Tage vor einer Injektion wurden 10 Bouillonröhrchen mit dem Keim beimpft und 24 Std. bei 37°C bebrütet. Am folgenden Tag wurde der Inhalt der Röhrchen 10 min. bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Bodensatz mit physiol. Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Diesen Vorgang wiederholten wir noch 2 mal, um die Keime von Nährbodenresten zu reinigen. Die gereinigte Suspension wurde vor dem Nephelometer auf einen gleichmäßigen Trübungsgrad eingestellt. Dann teilten wir die Suspension in 3 Teile.

Von der 1. Probe wurde in der üblichen Weise, durch Zusatz von 0,5 % Phenol und 1 Std. Hitzeexposition, bei 60°C im Wasserbad, hergestellt.

Die 2. Probe wurde im Röhrchen e, das dadurch 1 cm hoch gefüllt wurde, 40 min. lang bei 40°C im Aetosterilisationsapparat sterilisiert.

Die 3. Probe blieb als Kontrolle unbeeinflusst.

Von jeder Probe wurde 1 Quadrant einer Agarplatte sowie 1 Bouillonröhrchen beimpft. Erwiesen sich nach der Bebrütung die beiden ersten Proben als steril, und zeigte die letzte ein Wachstum von Keimen, so wurden die Tiere beimpft.

Die Impfung erfolgte in der Weise, daß zunächst 2 mal 0,5, dann jeweils 1,0 ml den Tieren intragluteal injiziert wurden. Der Abstand zwischen den einzelnen Injektionen betrug 3 Tage.

Insgesamt impften wir jedes Tier 14 mal. Der Versuch erstreckte sich über 6 Wochen. Während dieser Zeit zeigte keins der Tiere wesentliche krankhafte Veränderungen.

Auswertung der Versuche :

3 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere durch Entbluten getötet. Das Blut wurde getrennt steril aufgefangen und das Serum getitert.

Die Aufstellung einer Tabelle erübrigt sich in diesem Fall. Alle Seren titerten gleichmäßig bis zum 9. Röhrchen.

Eine Beeinflussung der antigenen Wirkung durch das Aeto ließ sich also nicht nachweisen. Dieser Nachweis gewinnt Bedeutung in Hinblick auf die Entkeimung von Impfstoffen.

Einfluß des Aeto auf die pyrogene Wirkung von Keimen :

Anläßlich früherer Untersuchungen (unveröffentlicht) hatten LAMMERS und GEWALT zufällig festgestellt, daß das Aeto die pyrogene Wirkung von Bakterien aufheben kann. Als Ursache dafür wurde eine chemische Beeinflussung der Lipoidfraktion der Bakterien, an die die pyrogene Wirkung gebunden sein soll, diskutiert.

Wir wollten nun versuchen, durch eine extrem lange Einwirkung des Aeto eine den Bedingungen der USP XIII genügende Herabsetzung der pyrogenen Wirkung zu erzielen.

Als pyrogene Substanz diente uns Pyrexal in fabrikmäßiger Herstellung.

Die Versuche führten wir gemäß den Bedingungen der USP XIII durch.

Es wurden 12 männliche Kaninchen ausgewählt, deren Körpergewicht zwischen 1,8 und 2,3 kg lag.

Die Körpertemperatur schwankte am Abend vor dem Versuch zwischen 38,5 und 39,5°C. Die Messung erfolgte thermoelektrisch mit Hilfe eines Gerätes, dessen Meßgenauigkeit $\pm 0,05^\circ\text{C}$ betrug. Die Meßelektrode wurde den Tieren 6 cm tief in das Rektum eingeführt.

Die Tiere blieben 24 Std. vor Beginn des Versuches nüchtern und wurden in getrennten Käfigen gehalten.

Die Kanülen und Spritzen für die Injektion wurden 1 Std. bei 240°C sterilisiert. Dabei sollen alle pyrogenen Substanzen sicher vernichtet sein.

Wir teilten die 12 Tiere in 2 Gruppen ein.

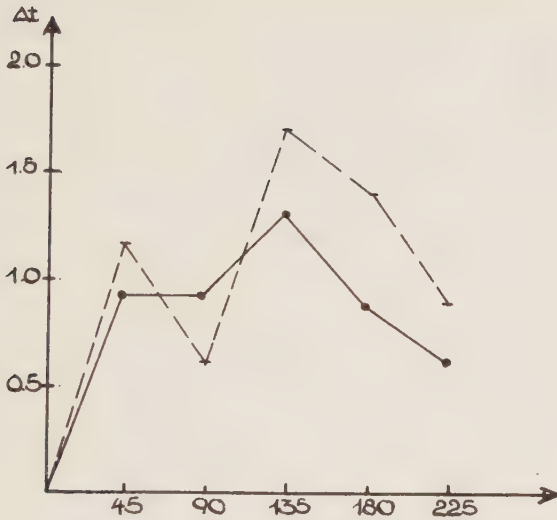


Abb.5 : Beeinflussung der pyrogenen Wirkung von Pyrexal durch Aeto bei 5 atü und 60°C über 180 min. Injektion von 1 Gamma/kg KG
----- = Pyrexal ohne Aeto
———— = Pyrexal mit Aeto

Die 1. Gruppe erhielt 1 Gamma Pyrexalfestsubstanz/kg Körpergewicht in die Ohrvene injiziert, die 2. 1,5 Gamma.

In jeder Gruppe wurde 3 Tieren das unveränderte Pyrexal verabreicht. Die 3 übrigen Tiere jeder Gruppe erhielten Pyrexal, das 180 min lang dem Aeto bei 60°C ausgesetzt worden war.

Die Körpertemperatur der Tiere wurde unmittelbar vor der Injektion und 5 mal im Abstand von 45 min. nach der Injektion gemessen.

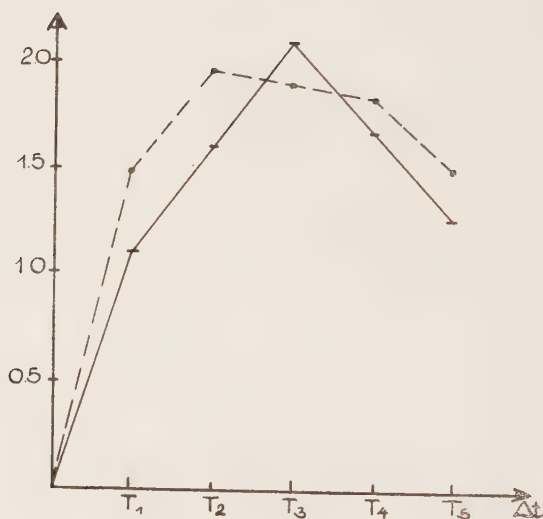


Abb.6 : Beeinflussung der pyrogenen Wirkung von Pyrexal durch Aeto bei 5 atü und 60°C über 180 min. Injektion von 1,5 Gamma/kg KG

----- = Pyrexal ohne Aeto

———— = Pyrexal mit Aeto

Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab.5 und 6 dargestellt. Diese Kurven geben die Mittelwerte des Temperaturanstieges an.

Abb.5 zeigt die Ergebnisse bei Injektion von 1 Gamma Pyrexalfests substanz/kg Körpergewicht an.

Das Pyrexal ohne Aetoeinwirkung (gestrichelte Linie) führt innerhalb der ersten 45 min zu einer mittleren Temperatursteigerung von 1,2°C gegenüber

dem Ausgangswert.

Nach 90 min ist die Temperatur wieder etwas abgesunken. Sie liegt nur noch $0,7^{\circ}\text{C}$ über dem Ausgangswert.

Nach 135 min. zeigt sich der häufig beobachtete 2. Gipfel. Die Steigerung der Temperatur liegt mit $1,8^{\circ}\text{C}$ sogar noch über dem Wert von 45 min.

Über eine mittlere Erhöhung von $1,5^{\circ}\text{C}$ nach 180 min. kommt es dann zu einem Rückgang auf $1,0^{\circ}\text{C}$ Unterschied nach 225 min.

Bei der Injektion des Pyrexal, das dem Aeto ausgesetzt worden war (durchgezogene Linie), ist der Temperaturanstieg deutlich niedriger. Die höchste Steigerung wird auch hier nach 135 min erreicht. Sie liegt jedoch mit $1,3^{\circ}\text{C}$ um $0,5^{\circ}\text{C}$ unter dem Wert der Kontrolltiere.

Die Ergebnisse der 2. Gruppe haben wir in Abb. 6 kurvenmäßig zusammengefaßt.

Wie zu ersehen, führt die Injektion von 1,5 Gamma Pyrexalfestsubstanz/kg Körpergewicht zu einem wesentlich stärker ausgeprägten Temperaturanstieg. Eine Kurve mit 2 Gipfeln konnte allerdings nicht mehr nachgewiesen werden. Vermutlich hat die hohe Dosis den Kurvenverlauf etwas verwischt.

Auch bei dieser Gruppe war die Temperatursteigerung nach Injektion des unveränderten Pyrexals mehr ausgeprägt wie nach Injektion des dem Aeto ausgesetzten. Nur der Gipfelwert bildet eine Ausnahme. Das dürfte aber dadurch bedingt sein, daß 1 Tier dieser Gruppe an der Stelle des Gipfels einen Temperaturabfall auf $0,3^{\circ}\text{C}$ Unterschied gegenüber dem Ausgangswert hatte. Die beiden anderen Tiere lagen deutlich über dem Gipfel für das veränderte Pyrexal.

Es läßt sich also deutlich eine Abschwächung der pyrogenen Wirkung durch das Aeto nachweisen. Die erhoffte völlige Beseitigung konnte jedoch nicht erreicht werden. Wir haben daher dieses Problem nicht weiter verfolgt, da keine wesentlichen Vorteile gegenüber anderen Verfahren zu erkennen waren.

Diskussion :

Durch unsere Versuche sollte geklärt werden, ob sich die guten Ergebnisse, die mit gespanntem Aeto bei der Sterilisation von Trockenkulturen gemacht worden waren, auch bei der Sterilisation infizierter Flüssigkeiten bestätigen ließen. Die bereits zu diesem Fragenkomplex unternommenen Versuche sollten überprüft werden.

Wir glauben auf Grund der dargestellten Versuchsergebnisse, daß das Aeto auch bei der Sterilisation infizierter Flüssigkeiten wesentliche Vorteile gegenüber anderen Methoden der Entkeimung bietet.

Die grundlegende Forderung, daß ein Sterilisationsverfahren eine sichere Vernichtung aller Keime unter Einschluß der Sporen gewährleistet, wurde in unseren Versuchen in ausreichendem Maße erfüllt. Die sporenreiche Gartenerde, international als Test für diese Zwecke anerkannt, war nach 65 min sicher keim- und sporenfrei.

Die Kulturaufschwemmungen weniger resistenter Keime waren schon nach einer wesentlich kürzeren Zeit steril.

Da jedoch in praxi stets mit der Anwesenheit resistenter Sporen, wie sie sich in der Gartenerde finden,

gerechnet werden muß, ist stets eine Sterilisationsdauer von 65 min erforderlich.

Diese Zeit ist im Vergleich zu den von LAMMERS und GEWALT (67-70) gewonnenen Ergebnissen wesentlich länger. Als Erklärung dafür könnte dienen, daß das Aeto eine gewisse Zeit benötigt, um die Flüssigkeit zu durchdringen. Außerdem ist auch eine bestimmte Anheizzeit erforderlich, um die Flüssigkeit auf die erforderliche Temperatur zu bringen.

Gegenüber der Anwendung flüssigen Aetos bzw. von gasförmigem Aeto bei Unter- und Normaldruck läßt sich dagegen eine deutliche Verkürzung der Sterilisationsdauer erkennen.

Von den in der Einleitung angeführten Sterilisationsverfahren führen auch einige andere innerhalb von 60 min zur Keimfreiheit. Keine Methode geht aber so wie die von uns angewendete ohne qualitative und quantitative Veränderungen einher. Hervorzuheben ist fernerhin die fehlende Hemmung der keimtötenden Wirkung durch Serum usw.

Die Ursache für die gute sporicide Wirkung des Aeto ist noch nicht geklärt.

FRAENKEL (28) und seinen Mitarbeitern gelang der Nachweis, daß Epoxyde, zu denen auch das Aeto zählt, mit den funktionellen Gruppen der Proteine reagieren können. Bei der Einwirkung des Aeto auf die Phenol- und SH-Gruppen entstehen so Aether und Thiaether.

PHILLIPS (79-81) glaubt, daß von der Reaktion überwiegend die Carboxylgruppen betroffen werden, wodurch der isoelektrische Punkt der Proteine um etwa 3 Einheiten gehoben wird. Diese alkalisierende Wirkung des Aeto soll für seinen Einfluß gegenüber

den Sporen **verantwortlich** sein. Er wies nach, daß die meisten chemischen Substanzen nur mit den SH-Gruppen reagieren können, die bei den Sporen durch Besonderheiten im Aufbau nur schwer angreifbar sein sollen. Demgegenüber besitzt seiner Meinung nach das Aeto die Fähigkeit, auch mit anderen Endgruppen zu reagieren.

Im Hinblick auf die Toxizität des Aeto sind unsere Versuche mit dem Influenzavirus interessant.

GREEN und BIRKELAND (zit. n. 31) gaben an, daß sich Hühnerembryonen besonders zur Testung der Toxizität eignen. REDDISH (bemerkt zwar hierzu (85), daß diese Empfindlichkeit im allgemeinen überschätzt wird, dennoch gewinnen unsere Versuche in dieser Richtung an Bedeutung.

Wie bereits erwähnt, setzten wir die influenza-infizierte Allantoisflüssigkeit dem Aeto aus und verimpften sie dann auf Bruteier. Nur einige der Eier zeigten nach der Beimpfung ein Absterben des Keimlings. Die überwiegende Mehrheit überlebte dagegen, was als Beweis für die geringe Toxizität bzw. die geringe Haftfähigkeit des Aeto gewertet werden kann.

Bei den Versuchen mit Viren verdient weiterhin die Tatsache hervorgehoben zu werden, daß selbst die resistenten Theilerviren nach 40 min sicher abgetötet waren.

Im übrigen ließen sich bei den Viren keine so deutlichen Abstufungen der Sterilisationsdauer feststellen wie bei den übrigen getesteten Keimen.

Viren, deren Resistenz gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen als sehr unterschiedlich bekannt ist, zeigten in unseren Versuchen

eine einheitliche Überlebenszeit von 30 min. Dazu muß allerdings einschränkend bemerkt werden, daß Unterschiede von weniger als 10 min in unseren Versuchen nicht erfaßt werden konnten.

Die Einschränkungen, die von LAMMERS und GEWALT (67 - 70) bezüglich der Menge der zu sterilisierenden Stoffe gemacht wurden, sind nach unserer Meinung in dieser Ausdehnung nicht erforderlich. Wir haben in unseren Versuchen mehr als 2,0 g Material sterilisiert und jedesmal volle Keimfreiheit erreichen können.

Eine signifikante Verkürzung der Sterilisationsdauer durch Erhöhung der Temperatur von 40 auf 60°C konnten wir nicht erzielen. Sofern eine Verkürzung vorhanden sein sollte, müßte sie unter 10 min betragen.

Die 30 min sterilisierten Proben führten bei der Inaktivitätskontrolle ebenso schnell zum Tode der Tiere wie die Kontrolle der Infektiosität, d.h. also wie die unveränderte Virussuspension. Eine Abschwächung der Virulenz durch das Aeto ließ sich nicht nachweisen.

Bei den Ergebnissen der Prüfung der Temperaturwirkung ist auffällig, daß die Influenzaviren verhältnismäßig hitzeresistent waren. Eine ähnliche Beobachtung wurde jedoch auch von Bühnagel (12) gemacht.

Die Versuche mit variiertem Flüssigkeitsmenge bestätigen unsere Annahme, daß es am günstigsten ist, eine bestimmte Flüssigkeitsmenge möglichst flach in ein möglichst weites Gefäß zu füllen. Unter diesen Voraussetzungen ist die Sterilisationsdauer am kürzesten. Die Gründe dafür wurden bereits erörtert.

Die größte Flüssigkeitsmenge, die wir in unseren Versuchen sterilisierten, betrug allerdings nur 184,0 ml. Bei größeren Flüssigkeitsmengen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht geprüft werden sollten, könnten Abweichungen von dieser Regel dadurch auftreten, daß eine längere Zeit zur Erwärmung der Flüssigkeit erforderlich wird, und sich dadurch die Sterilisationsdauer verlängert.

Aus unseren Versuchen lassen sich auch die Ergebnisse von KAEMMERER (49) erklären. Dieser hatte bei seinen Versuchen zur Sterilisation ärztlicher Instrumente gefunden, daß zur Entkeimung von Injektionskanülen eine überraschend lange Zeit erforderlich war. Der Grund dafür liegt darin, daß die dünnen Kanülen nach der Reinigung im allgemeinen mit Flüssigkeit gefüllt sind. Je länger die Nadel, desto länger ist die Flüssigkeitssäule in ihr. Das Gas muß daher, ebenso wie in unseren Versuchen mit hoher Füllung der Gefäße, die Flüssigkeit erst von einem bis zum anderen Ende der Kanüle durchdringen, bevor seine sterilisierende Wirkung voll einsetzen kann.

Versuche zur Herstellung von nicht mehr infektiösem Antigen mit Hilfe von Aeto sind, wie aus der Einleitung hervorgeht, schon frühzeitig unternommen worden. Alle Verfahren litten jedoch an der erforderlichen langen Dauer.

LAMMER und GEWALT (67-70) dagegen hatten unter Verwendung von gespanntem Aeto nach kurzer Zeit ein nicht mehr infektiöses stabiles Antigen erhalten, das sich in keiner Weise von dem mit Phenol hergestellten unterschied.

Diese guten Ergebnisse konnten wir bestätigen. Die mit gespanntem Aeto hergestellte Vaccine führte bei

der Verimpfung auf Kaninchen zum gleichen Antikörpertiter im Serum wie das mit Phenol hergestellte Antigen.

Die erhoffte Beseitigung der pyrogenen Wirkung durch extrem langes Einwirken von Aeto konnten wir dagegen nicht erreichen. Die pyrogene Wirkung wurde in unseren Versuchen durch das Aeto zwar merklich abgeschwächt, die erforderliche völlige Beseitigung gelang uns jedoch nicht.

Zusammenfassung :

In der vorliegenden Arbeit sollte geprüft werden, ob die guten Erfahrungen, die bei der Sterilisation von Trocken-Kulturen mit Hilfe von gespanntem Aethylenoxyd gesammelt wurden, auch für die Entkeimung von Flüssigkeiten zutreffen.

Bei 40°C waren Suspensionen von versporter Gartenerde sicher steril, wenn sie 65 min dem Aeto bei 5 atü ausgesetzt wurden.

Virussuspensionen waren nach 40 min steril.

Die Anwesenheit von Serum verlängert die Sterilisationsdauer nicht.

Größere Flüssigkeitsmengen sterilisiert man am besten in weiten Gefäßen, in denen die Flüssigkeit den Boden nur flach bedeckt. Unter diesen Bedingungen ist die Sterilisationsdauer am kürzesten.

Das Verfahren eignet sich zur Herstellung von Antigenen. Eine völlige Beseitigung der pyrogenen Wirkung läßt sich nicht erreichen, lediglich eine Abschwächung.

Literatur :

- 1.) Affens, W.A., E.O. Haenni, R.A. Fulton :
Anal. Chem. 31, 1565-1568 (1959), zit.n.94
- 2.) Albrecht, J. :
Arch.f.Hyg. 141, 460-464 (1957)
- 3.) Allen, H.T., J.T. Murphy :
J. Am. Med. Ass. 172, 1759-1763 (1960)
- 4.) Amdur, M.O., J. Mead :
A M A Arch. Ind. Health, 14, 553-559 (1953)
- 5.) Anschel, J. :
Pharmaz. Industrie 21, 167-169 (1951)
- 6.) Anonymus :
Aerosol Age 4, 63 (1959) zit.n.94
- 7.) Barlow, I.S., H.L. House :
Science 123, 229 (1956)
- 8.) Beard, H.C., R.B. Dunmire :
A M A Arch. Ind. Health 15, 67-169 (1951)
- 9.) Beilsteins Handbuch der org. Chemie
4. Aufl., 2. Ergänzungswerk, 17, 9-11
Springer Berlin (1952)
- 10.) Bekker, J.H., F.C. Ouvlee :
Ned. T. Genesk. 100, 1441-1445 (1946)
- 11.) Bock, M. :
Arzneimittelforschung 6, 527-531 (1956)
- 12.) Bünnagel, W. :
Med. Diss. Mainz (1959)
- 13.) Bucca, M.A. :
J. Bact. 71, 491-492 (1952)
- 14.) Cantzler, A. :
Chem. Ing. Techn. 29, 291-293 (1951), zit.n.94
- 15.) Church, B.D. et al. :
J. Bact. 72, 242-247 (1956)

- 16.) Coretti, K. :
Fleischwirtschaft 2 , 183-191 (1957)
- 17.) Cotton, R., R.C. Roark :
Ind. Eng. Chem. 20 , 205 (1928)
- 18.) Dawson, M. Todd, J. P. :
J. Pharm. Pharmacol. 4 , 972-977, (1952)
- 19.) Dawson, M., J. P. Todd :
J. Pharm. Pharmacol. 6 , 317-321 (1954)
- 20.) Deckert, W. :
Angewandte Chemie 42 , 559-562 (1932)
- 21.) Döttl, K. :
Medizin und Chemie , 4. Aufl., S. 538
Verlag Chemie Berlin (1942)
- 22.) Deckert, W. :
Angewandte Chemie 82 , 297-307 (1930)
- 23.) Domagk, G. :
Deutsch. med. Wochenschr. 61 , 829 (1935)
- 24.) Eichholtz, F. :
Lehrbuch d. Pharmakol. 8. Aufl., S. 495-530
Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1955)
- 25.) Eismann, L. P. :
Military Surgeon 109 , 29-34 (1951)
- 26.) Fellowes, C. N. :
Ann. N. Y. Acad. Sci. 85 , 595-600 (1960)
- 27.) Flury, F., F. Zernik :
Schädliche Gase , Berlin (1931) , zit. n. 94
- 28.) Fraenkel, H. :
J. Biol. Chem. 154 , 227-233 (1944)
- 29.) Friedl, I. et al. :
J. Ass. Off. Agric. Chem. 39 , 480-483 (1956)
zit. n. 94
- 30.) Fulton, I. D. :
US Armforces Med. J. 3 , 425-439 (1952), zit. n. 94
- 31.) Fust, B. :
Vortrag auf dem VI. Kongr. f. mikrobiol.
Standardisierung, 5.-10. Okt. 1960, Wiesbaden

- 32.) Gaudin, A.M., A.L. Mular :
Appl. Microbiol. 8 , 84-97 (1960)
- 33.) Gewalt, K., Fischer, E. :
Münch. med. Wochenschr. 101 , 563-565 (1959)
- 34.) Ginsberg, H.S., A.T. Wilson :
Proc. Soc. Biol. Med. 73 , 614 (1950)
- 35.) Gottsacker, E. :
Medizin u. Chemie, S. 553, 4. Aufl., Verlag Chemie
Berlin 1942
- 36.) Gönnert, R. Bock, M. :
Arzneimittelforschung 6 , 522-527 (1956)
- 37.) Griffith, C.L., L.A. Hall :
USA Patent No 2689947 vom 27.5.1957, zit. n. 94
- 38.) Gross, I.M., L.F. Dixon :
USA Patent No 2075845 vom 5.5.1933, zit. n. 94
- 39.) Grundy, W.E., et al. :
J. Am. Pharm. Ass. (Sci. Ed.) 46 , 439-442 (1957)
- 40.) Habs, H. :
Bakteriol. Taschenbuch, 37. Aufl., J.A. Barth Verlag
Leipzig, (1956), S. 91-93, 114
- 41.) Haenni, E.O., et al. :
Ind. Ing. Chem. , 51 , 605 (1959) zit. n. 94
- 42.) Haenni, E.O., K.A. Fulton :
Soap Chemie Spec. 35 , 101-105 (1959) zit. n. 94
- 43.) Hansen, H.M., W.C. Snyder :
Phytopathol. 37 , 369-371 (1947)
- 44.) Hawk, E.M., E.N. Michelsen :
Science 121 , 442-444 (1955)
- 45.) Heicken, K., H. Bellinger :
Zbl. Bakt. (I. Orig.) 179 , 237-244 (1956)
- 46.) Hirst, K. :
J. Exper. Med. 75 , 49 (1942)
- 47.) Jakobson, K.H. , et al. :
A M A Arch. Ind. Health 13 , 237-244 (1956)
- 48.) Judge, L.F., M.J. Pelczar :
Appl. Microbiol. 3 , 292-295 (1955)

- 49.) Kaemmerer, E. :
Med.Klinik 53 , 1411-1414 (1958)
- 50.) Kaye, S. :
Am.J.Hyg. 50 , 289-295 (1949)
- 51.) Kaye, S. :
Bact.Proc. 57 , 22 (1957)
- 52.) Kaye, S., C.R.Phillips :
J.Lab.Clin.Med. 40 , 67-72 (1952)
- 53.) Kaye, S. :
J.Lab.Clin.Med. 35 , 823-828 (1950)
- 54.) Kelch, F., K.Coretti :
Fleischwirtschaft 11 , 833 (1959)
- 55.) Kennedy, R.Z., G.W.Jones :
Ind.Eng.Chem. 20 , 805 (1928)
- 56.) Kennedy, R.Z., G.W.Jones :
Ind.Ing.Chem. 22 , 146-147 (1930)
- 57.) Kimming, J. :
Med.Diss.Mainz 1957
- 58.) Klarenbeck, A., H.A.E.van Tongeren :
J.Hyg.(London) 52 , 525-528 (1959)
- 59.) Kliewe, H. :
Vorlesungsmanuskript 1959/60
- 60.) Kliewe, H., Th.Lammers :
Ärztliche Praxis 11 , 1857-1858 (1959)
- 61.) Kliewe, H. :
Fiat.Rev.Hyg.Bd.2 (1948)
- 62.) Kliewe, H. :
in Esmarchs Taschenbuch d.Hyg., Springer Verlag
Berlin, Göttingen, Heidelberg (1950) S.605-628
- 63.) Kliewe, H. :
in "Die ansteckenden Krankheiten", Stuttgart
Thieme Verlag 1950 S.956-1080
- 64.) Körnlein, M., M.Seibel :
Die neue Verpackung 12 , 716-719 (1959)
- 65.) Kuprianoff, H. :
Steinkopf Verlag Darmstadt 1960, zit.n.59

- 66.) Kuschinsky, G. :
Taschenbuch d. mod. Arzneimittelbeh.
Thieme Verlag Stuttgart, 2. Aufl. (1958)
- 67.) Lammers, Th. :
Zbl. Bakt. (I. Ref.) 169 , 409-410 (1958)
- 68.) Lammers, Th., H. Day, M. Körnlein, M. Seibel :
Zs. Hyg. 146 , 236-240 (1960)
- 69.) Lammers, Th., K. Gewalt :
Zs. Hyg. 144 , 350-358 (1957)
- 70.) Lammers, Th., M. Seibel :
Die neue Verpackung 6 (1958)
- 71.) Lautenschläger, C. L. :
50 Jahre Arzneimittelforschung Thieme Verlag
Stuttgart (1955)
- 72.) Mayr, G. :
Zbl. Bakt. (I. Ref.) 169 , 411-412 (1958)
- 73.) Mayr, G., H. Kaemmerer :
Mitteil. d. Versuchstat. d. Gärungsgew. Wien
 1 , 2 (1957) zit. n. 94
- 74.) Moeller, K. O. :
Lehrbuch d. Pharmakol., Schwabe & Co Verlag
Basel, Stuttgart, 3. Aufl. (1958) S. 53
- 75.) Negherbon, W. O. :
Handbook of Toxicol., W. B. Sallanders & Co
Philadelphia 1959
- 76.) Nordgreen, H. :
Acta pathol. Microbiol. Scand. Suppl. 40 (1939)
mündl. Mitt. Prof. Lammers
- 77.) Opfel, I. B., J. P. Holzmann, A. B. Lablam :
J. Am. Pharm. Ass. (Sc. Ed.) 48 , 617-619 (1959)
- 78.) Perkins, J. J. :
Principles and Meth. of Sterilis., Springfield (1956)
- 79.) Phillips, C. K. :
Am. J. Hyg. 50 . 280-288 (1949)
- 80.) Phillips, C. R. :
Bact. Rev. 16 , 135-138 (1952)

- 81.) Phillips, C.R., S.Kaye :
Am.J.Hyg. 50 , 270-279 (1949)
- 82.) Polley, J.R. :
Proc.Soc.Exper.Biol.Med. 81 , 302-304 (1952)
zit.n.94
- 83.) Ponci, R. :
Il Farmaco (Ed.Pr.) 12 , 460-466 (1957) zit.n.94
- 84.) Rauscher, H., G.Mayr, H.Kaemmerer :
Food Manufacture 32 , 169-172 (1951) zit.n.94
- 85.) Reddish, C.F. :
Antiseptics, Fungicides, Desinfectants and
Sterilisation , Lea & Febeger, Philadelphia (1954)
- 86.) Roberts, I.L., et al. :
J.Bact. 45 , 40 (1943)
- 87.) Royce, A., C.Bowler :
J.Pharm.Pharmacol. 11 , 294-298 (1959)
- 88.) Sager, H., R.Iten :
Schweizer Apothekerzeitung 97 , 1039-1049 (1959)
- 89.) Schley, D.G. , et al. :
Appl.Microbiol. 8 , 15-19 (1960)
- 90.) Schmidt, H. :
in "Grundlagen der spez.Therapie", Schultze Verlag
Berlin (1940) S.55-65
- 91.) Schweizerische Unfallversicherungsanstalt :
Form.1469, Luzern (1959)
- 92.) Sexton, R.J., E.V.Henson :
J.Ind.Hyg.Tox. 31 , 297-300 (1949)
- 93.) Smith, K.L. :
J.Pharm.Pharmacol. 6 , 309-316 (1954)
- 94.) Bühlmann, H., Th.Lammers et al. :
Schweiz.Med.Wochenschr. 91 , Nr.20 , 607-613 (1961)
" " " " 91 , Nr.21 , 635-639 (1961)
- 95.) Stehle, R.L. et al. :
Arch.Exper.Path.Pharm. 104 , 83-85 (1924)
- 96.) Thon, D., M.Neumann :
Zbl.Bakt.(I.Orig.) 176 , 256-259 (1959)

- 97.) Thon, D., M. Neumann :
Zbl. Bakt. (II. Orig.) 113 , 114-127 (1959)
- 98.) Velu, H. , et al. :
Bull. Acad. Méd. (Paris) 126 , 62 (1942)
zit. n. 94
- 99.) Waite, C. P. et al. :
Public Health 45 , 1832-1843 (1936)
- 100.) Walker, W. J. G., C. E. Greeson :
J. Hyg. (London) 32 , 409-410 (1932)
- 101.) Walter, C. W. :
J. Am. Med. Ass. 170 , 1543-1544 (1959)
- 102.) Westphal, K. :
Verhandl. Deutsche Ges. f. Inn. Med., 62. Kongr.
Mündl. Mitt. Prof. Lammers
- 103.) Wilson, A. T., F. Bruno :
J. Exper. Med. 91 , 449 (1956)
- 104.) Windmüller, H. G., C. J. Ackermann, K. W. Engel :
J. Nutrit. 60 , 527-537 (1956)

Lebenslauf

Am 29.3.1936 wurde ich in Bitterfeld/Prov. als viertes und vorletztes Kind des Ingenieurs Richard Kaltwasser und seiner Ehefrau Rosa, geb. Goedecke, geboren. Vom 1.9.1942 an besuchte ich in meinem Heimatort die Grundschule und anschließend den sprachlichen Zweig der Oberschule, an der ich 1954 das Abitur bestand.

Am 1.9.1954 wurde ich bei der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg immatrikuliert, an der ich bis zum März 1959 studierte. 1956 legte ich dort das Physikum ab.

Vom Sommersemester 1959 an studierte ich an der Medizinischen Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz, wo ich im Juni 1960 das Medizinische Staatsexamen bestand.

Seit dem 1.11.1960 arbeite ich am Städtischen Krankenhaus in Passau als Medizinalassistent.

Die Versuche zu der vorliegenden Inaugural-Dissertation führte ich vom August 1959 bis zum Oktober 1961 unter der Leitung von Herrn Doz. Dr.med.habil.E.v.Wasielewski am Hygienischen Institut der Medizinischen Fakultät in Mainz durch.

Es ist mir ein Bedürfnis, Herrn Prof.emer.
H.Kliewe für die Überlassung des Arbeits-
platzes in seinem ehemaligen Institut, und
Herrn Dor.Dr.med.habil.E.v.Wasielewski für
die ständige Unterstützung und Anregung bei
der Durchführung der Versuche und der Ausar-
beitung des Textes zu danken.

